

Über die Adsorption von Allergenen und Nukleinsäuren an Calciumcarbonat sowie die chemische Umwandlung von Goldalgen in elementares Silicium

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Janina Petrack

geboren in Essen

Institut für Anorganische Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

2014

Meinen beiden Liebsten

Nur indem man das Unerreichbare anstrebt,

gelingt das Erreichbare.

Nur mit dem Unmöglichen als Ziel,

gelingt das Mögliche.

Miguel de Unamuno

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2011 bis Februar 2014 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias Epple am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. M Epple

Prof. Dr. C. Mayer

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Sand

Tag der Disputation: 03.06.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Kristalle.....	3
2.2 Kolloidchemie.....	8
2.3 Adsorption und Desorption.....	13
3. Geräte und Methoden.....	17
3.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotential.....	17
3.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Energiedispersive Röntgen- spektroskopie (EDX)	18
3.3 Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD)	19
3.4 Thermogravimetrie (TG)	20
3.5 Infrarot(IR)-spektroskopie	20
3.6 Elementaranalyse (EA) und Atomabsorptionsspektroskopie (AAS).....	21
3.7 UV/Vis-Spektroskopie.....	22
3.8 Enzyme linked immunosorbent-Assay (ELISA)	22
4. Ergebnisse und Diskussion.....	24
4.1 Adsorption von Naturlatex-Allergenen an Calciumcarbonat	24
4.1.1 Calciumcarbonat	24
4.1.1.1 Darstellung und Charakterisierung der polymorphen Calciumcarbonate.....	27
4.1.1.1.1 Synthese von Calcit, Aragonit und Vaterit	27
4.1.1.1.2 Charakterisierung von Calcit, Aragonit und Vaterit	28
4.1.1.2 Darstellung und Charakterisierung von amorphem Calciumcarbonat.....	35
4.1.1.2.1 Synthese von amorphem Calciumcarbonat.....	35
4.1.1.2.2 Charakterisierung von amorphem Calciumcarbonat	35
4.1.1.3 Untersuchungen zur Lösungsenthalpie der polymorphen Calciumcarbonate	
und von amorphem Calciumcarbonat	38

Inhaltsverzeichnis

4.1.2 Einführung in die Thematik der NRL-Allergene.....	46
4.1.2.1 Die verwendeten Calciumcarbonate	50
4.1.2.1.1 Charakterisierung der Calciumcarbonate der Firma SCHAEFER KALK .	50
4.1.3 Experimentelle Durchführung	57
4.1.3.1 Extraktion der Allergene aus Naturkautschukprodukten.....	57
4.1.3.2 Durchführung der Adsorptionsversuche	58
4.1.4 Ergebnisse der Adsorptionsversuche	58
4.1.4.1 Adsorption von Hev b 1	58
4.1.4.2 Adsorption von Hev b 3	64
4.1.4.3 Adsorption von Hev b 5	69
4.1.4.4 Adsorption von Hev b 6.02	75
4.1.4.5 Einfluss der Adsorption auf die verwendeten Calciumcarbonate.....	82
4.1.5 Desorptionsuntersuchungen der Allergene	88
4.1.5.1 Fertigung der Latex-Werkstücke	88
4.1.5.2 Durchführung der Desorptionsversuche	90
4.1.6 Ergebnisse der Desorptionsversuche vom Feststoff	91
4.1.6.1 Desorption von Hev b 1	91
4.1.6.2 Desorption von Hev b 3	96
4.1.6.3 Desorption von Hev b 5	101
4.1.6.4 Desorption von Hev b 6.02	105
4.1.7 Freisetzungsversuche aus den Werkstücken.....	109
4.1.8 Zusammenfassung.....	125
4.2 Darstellung, Charakterisierung und zellbiologische Untersuchung von Calciumcarbonat-Nanopartikeln	130
4.2.1 Einführung in die Thematik.....	130
4.2.2 Synthese der Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel und der mit Polyethylen-..... imin umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel	132
4.2.3 Durchführung der zellbiologischen Untersuchungen	133

Inhaltsverzeichnis

4.2.4 Charakterisierung der Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel und der mit..... Polyethylenimin umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel	135
4.2.5 Zellbiologische Untersuchungen der Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel	
und der mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumcarbonat-Nanopartikel.....	144
4.2.6 Zusammenfassung.....	149
4.3 Chemische Konversion von Goldalgen	151
4.3.1 Einführung in die Thematik	151
4.3.2 Durchführung der Experimente	152
4.3.3 Ergebnisse und Diskussion	154
4.3.4 Zusammenfassung.....	163
5. Zusammenfassung.....	165
6. Literaturverzeichnis	167
7. Anhang.....	177
7.1 Daten der Adsorptionsergebnisse mit PBS als Extraktionsmittel.....	177
7.2 Abkürzungsverzeichnis.....	184
7.3 Chemikalienverzeichnis.....	185
7.4 Publikationsliste.....	186
7.5 Lebenslauf.....	187
8. Eidesstattliche Erklärung.....	188
9. Danksagung	189

1. Einleitung

Calciumcarbonat ist eines der häufigsten Mineralien unserer Erde. Es existiert in den drei polymorphen Modifikationen Calcit, Vaterit und Aragonit. Daneben existieren noch die beiden pseudopolymorphen Modifikation Monohydrocalcit und Ikait sowie das amorphe Calciumcarbonat (ACC) und das durch den Einbau von Magnesiumionen stabilisierte amorphe Calciumcarbonat (Mg-ACC). In der belebten Natur wird Calciumcarbonat durch Biomineralisation gebildet. So sind Organismen in der Lage, auch metastabile oder instabile Modifikationen des Calciumcarbonats durch Interaktion mit unterschiedlichen Proteinen zu stabilisieren. In der Industrie findet Calciumcarbonat in vielen Bereichen Verwendung. Neben dem Einsatz in der Papier-, Bau-, Lebensmittel- und Kosmetikindustrie ist es vor allem bei der Stahlherstellung von Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit soll neben lösungskalorimetrischen Untersuchungen der polymorphen Calciumcarbonate und von ACC die Reduzierung von Latexallergenen durch Adsorption an unterschiedliche Calciumcarbonat-Substrate realisiert werden. Dazu werden die polymorphen Calciumcarbonate Calcit, Vaterit und Aragonit und weitere Calciumcarbonate, die von einem Kooperationspartner zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Neben Adsorptions- und Desorptionsuntersuchungen werden Naturlatex-Werkstücke hergestellt, in deren Matrix die Calciumcarbonate mit eingebaut sind, um die Freisetzung der Allergene zu quantifizieren.

Des Weiteren ist die Nanotechnologie in der heutigen Forschung von großem Interesse. Im Vergleich zu Mikropartikeln ist bei Nanopartikeln das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen so groß, dass sich physikalische und chemische Eigenschaften verändern können. Die Anwendungsbereiche von Nanopartikeln sind vor allem in der Oberflächenchemie, Nanoelektronik, Medizin und Biochemie zu finden. Nanopartikel werden im biochemisch-medizinischen Bereich unter anderem als Trägermaterial zur Transfektion von Zellen erforscht. Die Anforderungen an solche Trägermaterialien sind deswegen groß. So müssen diese nicht nur biokompatibel sein, sondern auch die Fähigkeit besitzen, gewisse Mengen an Wirkstoffen aufzunehmen und zielgerecht in die Zellen zu transportieren. In dieser Arbeit sollen funktionalisierte Calciumcarbonat-Nanopartikel mit einem halbkontinuierlichen Fällungsprozess dargestellt und zellbiologische Untersuchungen durchgeführt werden.

1. Einleitung

Neben Calciumcarbonat ist Siliciumdioxid, auch bezeichnet als Silica, ein sehr häufiges Biomineral, welches unter anderem von Schwämmen oder Algen gebildet wird. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als Biosilifikation. Aufgrund des Artenreichtums der natürlichen Silica-mineralisierenden Organismen und der charakteristischen strukturellen Merkmale ist die Verwendung solcher Biomineralien als Templat vor allem in der Halbleiter- und Solarindustrie von großer Bedeutung. In dieser Arbeit sollen *Mallomonas caudata* und *Synura petersenii*, welche zu den Chrysophyceae gehören, mittels chemischer Konversion in elementares Silicium umgewandelt werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Kristalle

Die Bildung von Kristallen ist ein thermodynamischer Prozess, der die Bildung von Festkörpern als Übergang in den kristallinen Zustand definiert.^[1, 2] Die klassische Kristallisationstheorie bezeichnet die Kristallisation im Allgemeinen als Übergang von Stoffen aus der Gasphase, Schmelze oder Lösung in den festen Aggregatzustand. Bei der Bildung von Kristallen sind zwei Schritte von Bedeutung: Zum einen die Keimbildung und zum anderen das Kristallwachstum.^[3, 4] Bei der Keimbildung unterscheidet man die heterogene und die homogene Keimbildung. Zur homogenen Keimbildung kommt es in einer übersättigten Lösung durch die spontane Bildung kleiner Keime, während bei der heterogenen Keimbildung Verunreinigungen, wie zum Beispiel Staub oder ein Kratzen an einer Glasoberfläche, benötigt werden, um die Keimbildung zu initiieren.^[3, 5, 6] Diese Wechselwirkungen mit der Umgebung führen dazu, dass die Konzentration der Lösung geringer sein kann als bei der homogenen Keimbildung. BECKER und DÖRING beschrieben zunächst die klassische Keimbildungstheorie.^[7] Diese vereinfacht das Modell und macht die Annahme, dass in einem homogenen Einstoffsystem selbst die kleinsten Keime schon die Eigenschaften der makroskopischen Phase besitzen (Kapillaritätstheorie).

Thermodynamisch betrachtet ist die Keimbildung ein Prozess, der mit der Änderung der freien Gibbs-Energie verbunden ist, welche vom Maß der Übersättigung abhängig ist. Die Übersättigung μ setzt sich aus den einzelnen Konzentrationen der Ionen in der übersättigten Lösung und der Konzentration des gebildeten Keims im Phasengleichgewicht zusammen.^[6, 8] Gleichung 1 veranschaulicht diesen Zusammenhang für ein System, bei dem die Ionen im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 miteinander reagieren.

$$\mu = \frac{c(A^+)_{\text{aq}} c(B^-)_{\text{aq}}}{[c(A^+)_{\text{aq}} c(B^-)_{\text{aq}}]_{\text{eq}}} \quad \text{Gleichung 1}$$

Die Änderung der freien Gibbs-Energie ist die Triebkraft zur Bildung von Keimen. Diese setzt sich neben der Änderung der Gibbs-Energie, die bei der Phasenumwandlung gewonnen wird (ΔG_v), aus der Änderung der freien Gibbs-Energie durch die entstandene

2. Theoretische Grundlagen

Grenzflächenenergie (ΔG_K) zusammen. Unter der Annahme, dass kugelförmige Keime gebildet werden, kann der Beitrag der Grenzflächenenergie vernachlässigt werden, so dass für die Änderungen der freien Energie folgender Zusammenhang gilt:^[8]

$$\Delta G = \Delta G_V + \Delta G_K \quad \text{Gleichung 2}$$

Dieser Zusammenhang für den Einfluss der Oberflächenenergie und der Volumenenergie auf die Keimbildung lässt sich auch grafisch veranschaulichen (Abbildung 1).

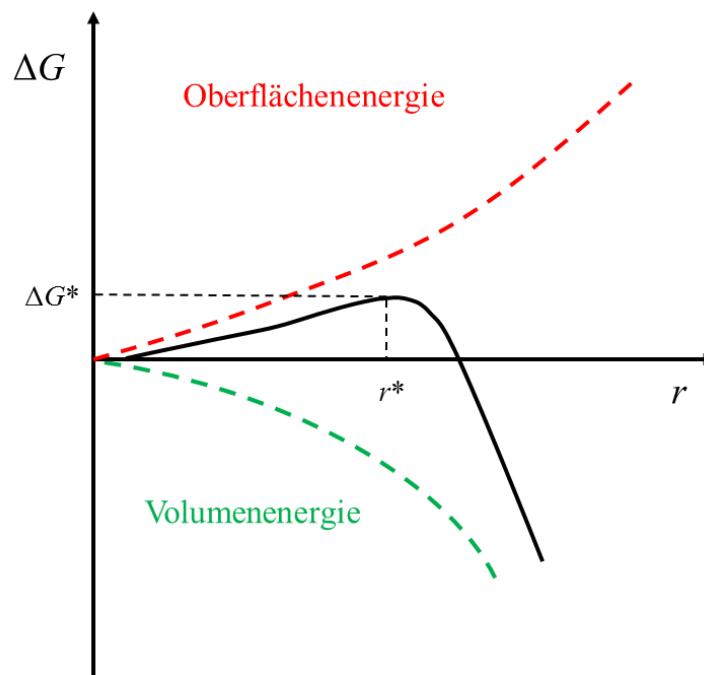


Abbildung 1: Abhängigkeit der freien Gibbs-Energie, welche durch Oberflächenenergie gewonnen werden muss, und der Änderung der freien Gibbs-Energie, welche durch die Änderung des Volumens resultiert, in Zusammenhang mit der kritischen Keimgröße r^* , bezogen auf den Keimradius r .

Betrachtet man Abbildung 1, so wird deutlich, dass bei der Bildung von Keimen mit dem Radius r die Oberflächenenergie zunimmt und der Anteil der Volumenenergie abnimmt. Die schwarze Kurve beschreibt die Summe der beiden Verläufe. In der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass bei kleinen Keimradien die Oberflächenenergie dominiert, während bei großen Keimradien die Volumenenergie den größten Beitrag zur freien Gibbs-Energie bildet. Die Summe der Energien durchläuft ein Maximum, welches aus dem kritischen Keimradius r^* und der kritischen Gibbs-Energie ΔG^* resultiert. Nach MULLIN ist an diesem Punkt die Gibbs-Energie definiert über:^[6, 9]

2. Theoretische Grundlagen

$$\Delta G^* = \frac{16 \pi \sigma^3 V^3}{3(k T \ln \mu)} \quad \text{Gleichung 3}$$

Gleichung 3 setzt sich zusammen aus dem molekularen Volumen V und der makroskopischen Oberflächenspannung σ der zu bildenden Phase, der Boltzmann-Konstante k , der Temperatur T und der Übersättigung μ .

Der kritische Keimradius r^* ist definiert über die Gibbs-Kelvin-Gleichung:^[10]

$$r^* = \frac{2 \sigma V}{k T \ln \mu} \quad \text{Gleichung 4}$$

Das bedeutet, dass ein Keim die erforderliche kritische Gibb-Energie ΔG^* aufbringen muss, um bis zum kritischen Keimradius r^* zu wachsen. Unterhalb dieses kritischen Keimradius lösen sich die Keime wieder auf. Beim Überschreiten des kritischen Keimradius r^* kommt es zum spontanen Wachstum der Keime.

Wenn Keime entstanden sind, folgt als nächster Schritt das Kristallwachstum, welches man sich vereinfacht als das Anlagern kleiner Einheiten an einen Kristall vorstellen kann. Dabei gibt es nach KOSSEL unterschiedliche Möglichkeiten für eine Einheit, sich an einen Kristall anzulagern.^[11] Diese unterschiedlichen Möglichkeiten unterscheiden sich nur aufgrund des resultierenden Energiegewinns. In Abbildung 2 sind diese sechs Möglichkeiten grafisch dargestellt.

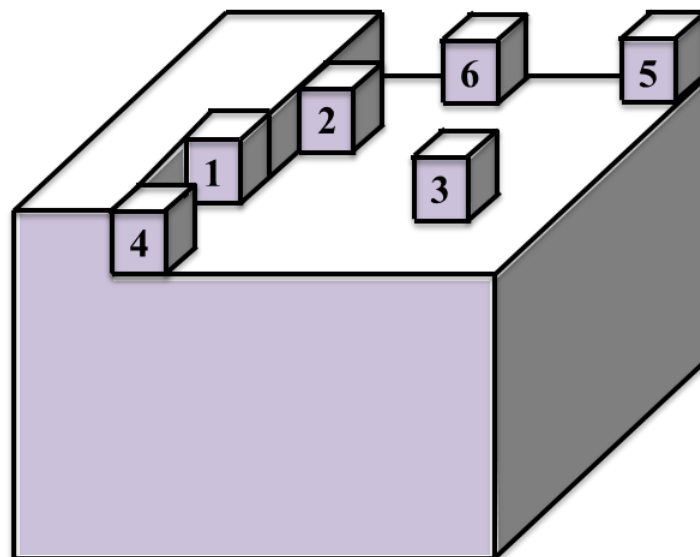


Abbildung 2: Die sechs Anlagerungsmöglichkeiten beim Stufenwachstum von Kristallen.^[12]

2. Theoretische Grundlagen

Die unterschiedlichen Energien werden näherungsweise durch die elektrostatischen Potentiale wiedergegeben. So sind diese Potentiale für das Kristallwachstum abhängig von den Positionen. Dies ist verständlich, da die Anlagerung an eine Halbkristalllage immer bevorzugt wird. Zudem ist ein Knick (Position 1 in Abbildung 2) bei der Anlagerung aufgrund der zwei Anlagerungsmöglichkeiten bevorzugt, da dieser Knick nach Anlagerung des Moleküls erhalten bleibt und keine Änderung der Oberflächenenergie zur Folge hat.^[13] Die Anlagerung von Bausteinen an eine Kristalloberfläche verläuft in sechs Teilschritten.^[2] Diese sind in Abbildung 3 dargestellt. Zunächst erfolgt der Transport des Bausteins zur Kristalloberfläche (I). Anschließend findet die Adsorption an die Oberfläche (II) und Umwandlung des Bausteins durch Desolvatation (z. B. Reorientierung, chemische Umwandlung, Konformationsänderungen) statt. Der dritte Schritt ist der Transport des Bausteins mittels Oberflächendiffusion zum Anlagerungspunkt an der Halbkristallebene. Es kann erneut zu Desolvatation kommen (IV). Des Weiteren kommt es zum Transport des Bausteins entlang der Stufenversetzung des Halbkristalls zum energetisch günstigsten Anlagerungspunkt (V). Unter Desolvatation (VI) wird das Teilchen angelagert und der Kristall weiter ausgebildet.

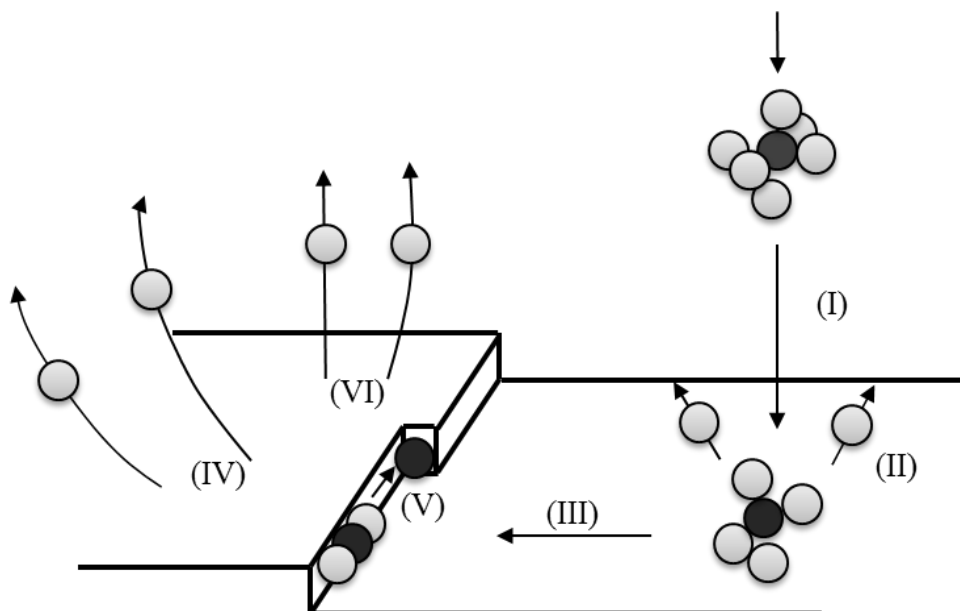


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Anlagerungsprozesses von Teilchen (schwarz) beim Stufenwachstum von Kristallen unter Desolvatation (grau).

Die Ostwaldsche Stufenregel besagt, dass bei der Bildung von Kristallen nicht sofort das thermodynamisch stabilste Produkt gebildet wird, sondern zunächst das Produkt mit der

2. Theoretische Grundlagen

geringeren Energiedifferenz zu den Edukten.^[14, 15] In Abbildung 4 ist dieser Vorgang schematisch für Calciumcarbonat dargestellt.

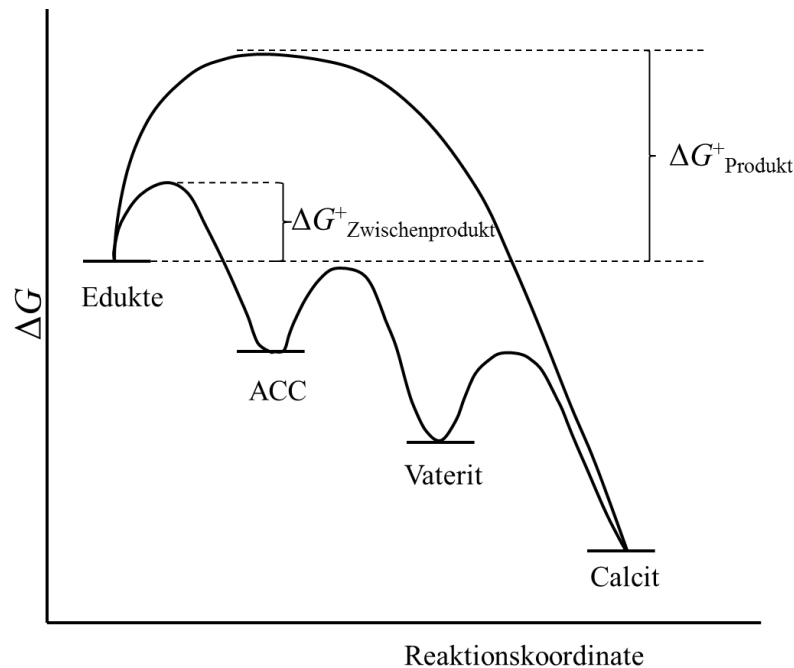


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Ostwaldschen Stufenregel bei der Bildung von Calciumcarbonat.^[16]

Das erste Produkt, welches laut der Ostwaldschen Stufenregel gebildet wird, ist amorphes Calciumcarbonat (ACC), eine Precursorphase bei der Kristallisation von Calcit und die Phase mit dem geringsten Energieunterschied zu den Edukten. Als weitere Phase würde zunächst Vaterit und schließlich Calcit entstehen, die thermodynamisch stabilste Phase des Calciumcarbonats. Vaterit ist eine metastabile Phase des Calciumcarbonats, die sich bei Normalbedingungen zu Calcit umwandelt. Die weitere metastabile Phase Aragonit wird in dieses Schema nicht mit einbezogen, da Aragonit eine Hochtemperaturphase ist, welche bevorzugt bei hohen Temperaturen entsteht und unter Normalbedingungen kinetisch stabil vorliegt. In Abbildung 4 ist somit zu erkennen, dass laut der Ostwaldschen Stufenregel zunächst instabile bzw. metastabile Phasen gebildet werden, bevor es zur Bildung der thermodynamisch stabilen Phase kommt. Die direkte Bildung von Calcit aus den Edukten tritt laut dieser Theorie nicht ein, da dies mit einer zu großen Aktivierungsenergie verbunden wäre.

2. Theoretische Grundlagen

2.2 Kolloidchemie

Nanopartikel sind Teilchen, deren Größe im Nanometerbereich liegt. Schon die Vorsilbe „Nano“ spricht für die geringe Größe der Teilchen.^[17] „Nano“ kommt aus dem Griechischen und bedeutet zu Deutsch „Zwerg“ oder auch „zwerghaft“. Dabei entspricht ein Nanometer (nm) 10^{-9} Meter (m). Im nanoskaligen Bereich ist im Gegensatz zur makroskopischen Phase das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen so groß, dass sich physikalische und chemische Eigenschaften des Materials verändern können. Aufgrund dieser Tatsache ist die Nanotechnologie von bedeutsamem Interesse und heutzutage in vielen Bereichen der aktuellen Forschung oder auch des alltäglichen Lebens mehr wegzudenken. So weisen Oberflächen, die mit Nanopartikeln beschichtet wurden, einen wasserabweisenden Effekt auf, den sogenannten Lotus-Effekt. Auch Cremes können nanopartikuläre Zusätze enthalten, die zum Beispiel vor UV-Strahlung oder Faltenbildung schützen sollen. In der Forschung ist die Nanotechnologie vor allem nicht mehr aus den Bereichen der Oberflächenchemie, Nanoelektronik, Medizin und Biochemie wegzudenken.^[18]

Kolloide sind disperse Systeme, bei denen Partikel mit einem Radius von 1 nm bis 500 nm in einem Dispersionsmedium feinverteilt vorliegen.^[17] Dabei besitzen Kolloiddispersionen keine kolligativen Eigenschaften, d. h. sie weisen keinen osmotischen Druck, keine Siedepunktserhöhung und keine Gefrierpunktserniedrigung auf. Kolloide wurden von STAUDINGER und OSTWALD unterschiedlich definiert. STAUDINGER teilte sie nach ihrer thermodynamischen Stabilität ein.^[17] Er unterschied Dispersionskolloide, Molekülkolloide und Assoziationskolloide. Bei Dispersionskolloiden handelt es sich um thermodynamisch instabile Systeme hydrophober Kolloide. Die kolloidale Verteilung ist weitgehend polydispers bzw. polyform, es handelt sich also um Teilchen unterschiedlicher Größe und Gestalt. Molekülkolloide sind thermodynamisch stabile, hydrophile Systeme. Die durchschnittliche Partikelgröße wird aus Makromolekülen gebildet, welche aus vielen verknüpften Atomen bestehen und eine geknäulte Form einnehmen. Assoziationskolloide werden auch Mizellkolloide genannt und sind thermodynamisch stabile hydrophile Systeme. Oberhalb der sogenannten kritischen Mizellenbildungskonzentration (CMC) kommt es zur Selbstorganisation der Moleküle (Tensidmoleküle mit polarem Kopf und unpolarem Rest), die von der Polarität des Lösungsmittels abhängig ist. OSTWALD teilte

2. Theoretische Grundlagen

Kolloidsysteme auf der Grundlage des Aggregatzustandes der dispergierten Phase und des Dispersionsmittels ein, was in Tabelle 1 gezeigt wird.^[17]

Tabelle 1: Einteilung von Kolloiden nach OSTWALD.^[17]

Bezeichnung	Dispergierte Phase	Dispersionsmittel	Beispiel
Festes Sol	fest	fest	Goldrubinglas
Suspension	fest	flüssig	Tinte
Festes Aerosol	fest	gasförmig	Staub
Feste Emulsion	flüssig	fest	Milchquarz
Emulsion	flüssig	flüssig	Butter
Flüssiges Aerosol	flüssig	gasförmig	Haarspray
Fester Schaum	gasförmig	fest	Styropor
Flüssiger Schaum	gasförmig	flüssig	Seifenschaum

Kolloide können elektrostatisch oder sterisch stabilisiert werden. Bei der sterischen Stabilisierung koordinieren Liganden an das Partikel, so dass bei Annäherung zweier kolloidaler Teilchen die Agglomeration verhindert wird. Bei der elektrostatischen Stabilisierung nutzt man den Effekt aus, dass gleiche Ladungen sich gegenseitig abstoßen. Durch die Verwendung von synthetischen oder natürlichen, geladenen Polymeren können Kolloide sowohl elektrostatisch als auch sterisch stabilisiert werden. Die Verwendung von ungeladenen Polymeren führt lediglich zur sterischen Stabilisierung.

Es ist bekannt, dass zum Beispiel Silbernanopartikel oder Goldnanopartikel mit dem ungeladenen Polyvinylpyrrolidon (PVP) funktionalisiert werden können und diese Dispersionen über einen längeren Zeitraum stabil sind.^[19, 20] Dahingegen führt die Verwendung von geladenen Polymeren sowohl zur sterischen, als auch zur elektrostatischen Stabilisierung. Ferner können Eisenoxid-Nanopartikel mit dem Biopolymer Polylactid und Cobalt-Nanopartikel mit Polymethacrylat stabilisiert werden.^[21, 22] Auch Calciumphosphate lassen sich mit einer Vielzahl von Polymeren funktionalisieren. So können Polyallylaminhydrochlorid (PAH), Polystyrolsulfonat (PSS), das Natriumsalz der Polyacrylsäure (PAA), Desoxynucleinsäure (DNA) oder auch

2. Theoretische Grundlagen

Carboxymethylcellulose (CMC) verwendet werden.^[23–25]

Dabei ist es wichtig, die richtige Polymerkonzentration zu finden, welche die Kolloide stabilisiert, da die Partikel sonst nicht die gewünschte Stabilität besitzen. Abbildung 5 zeigt die Abhängigkeit der Partikelstabilität von der Polymerkonzentration. Bei zu geringer Polymerkonzentration kann es zur sogenannten Überbrückungsflockung oder Brückenflockung kommen. Die Kolloide in der Dispersion sind nicht stabil, da es zur Adsorption einer Polymerschleife an mehreren Partikeln kommen kann (a). Wird die Polymerkonzentration erhöht, so kommt es zur sterischen Stabilisierung; die Partikel in der Dispersion sind meist über mehrere Wochen stabil (b). Bei weiterer Polymerzugabe kommt es zunächst zur Verminderungsflockung (c) und schließlich zur Verminderungsstabilisierung (d). Durch die Menge an Polymer wird ein Zusammenstoß zwischen zwei Partikeln erschwert, obwohl keine sterische Stabilisierung vorliegt. Obwohl diese Kolloide instabil sind, koagulieren sie nicht, wie man erwarten würde, nach kürzester Zeit, d. h. die Koagulation ist kinetisch gehemmt.

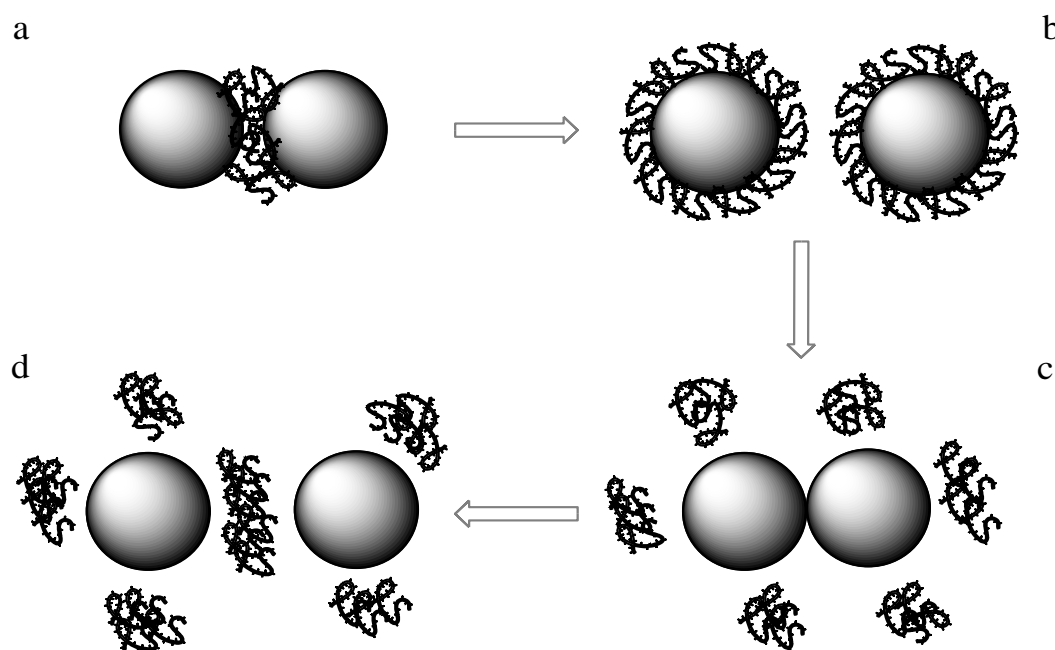


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Stabilität von Nanopartikeln bei unterschiedlichen Polymerkonzentrationen.

Unter anderem kann die Stabilität von Kolloiden mit der Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht begründet werden. Um Kolloide, die selbst eine Ladung besitzen, lagert sich eine Schicht aus der entsprechenden Gegenladung an, die sogenannte Sternschicht, auch starre Schicht genannt. Um diese Schicht herum lagern

2. Theoretische Grundlagen

sich weitere Ionen an, vor allem wieder mit der entgegengesetzten Ladung, da das Elektroneutralitätsprinzip gewährleistet sein muss. Diese Schicht nennt man diffuse Schicht (siehe Abbildung 6).

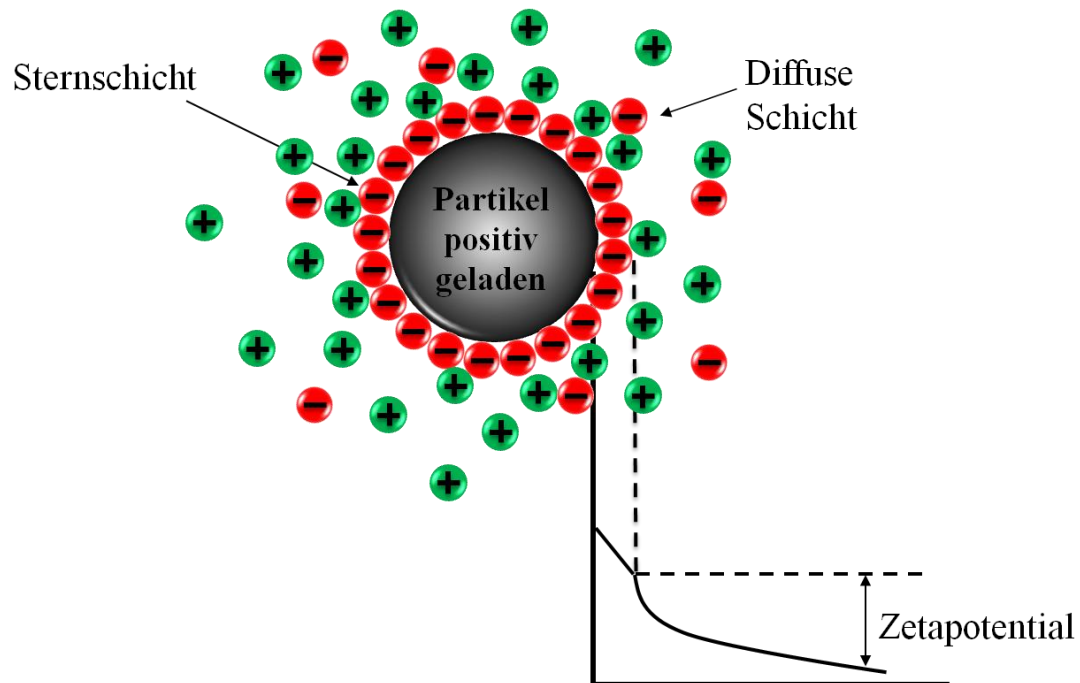


Abbildung 6: Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht und des Zetapotentials.

Bewegt sich nun das kolloidale Teilchen, so bewegt sich immer ein Teil der diffusen Schicht mit, welche das Teilchen vor Agglomeration schützt, da es anderen Kolloiden nicht möglich ist, diese Doppelschicht zu durchstoßen. Diesen sich mitbewegenden Teil bezeichnet man als Scherradius. Aufgrund der unterschiedlichen Ladungen existiert ein Potentialabfall von der Sternschicht über die diffuse Schicht bis hin zum umgebenden Medium. Dabei verläuft der Potentialabfall in der Sternschicht linear und zwischen der diffusen Schicht und dem umgebenden Medium exponentiell. Die Potentialdifferenz, die daraus entsteht, bezeichnet man als Zetapotential. In Abbildung 6 ist dieser Zusammenhang verdeutlicht.

Das Zetapotential ist ein Maß für die Ladung der kolloidalen Teilchen und kann mittels der elektrophoretischen Mobilität bestimmt werden. Kolloidale Dispersionen mit einem Zetapotential von größer ± 30 mV gelten als stabil.^[26] In Bereichen dazwischen kann es zur Ausflockung, also zur Bildung von Agglomeraten der Partikel kommen, da die Partikeldispersion keine ausreichende Stabilität besitzt.

Weitere Gründe für die Stabilität von Kolloiddispersionen liefert die DLVO-Theorie (benannt nach DERJAGUIN, LANDAU, VERWEY und OVERBEEK). Diese Theorie

2. Theoretische Grundlagen

besagt, dass die Stabilität durch Wechselwirkungen zwischen anziehenden, van-der-Waals, und abstoßenden, elektrostatischen Kräften zustande kommt. In Abbildung 7 sind vier Möglichkeiten von Potentialverläufen schematisch dargestellt. Dabei ist die Änderung der Freien Energie ΔG gegen den Abstand der Teilchen H aufgetragen.

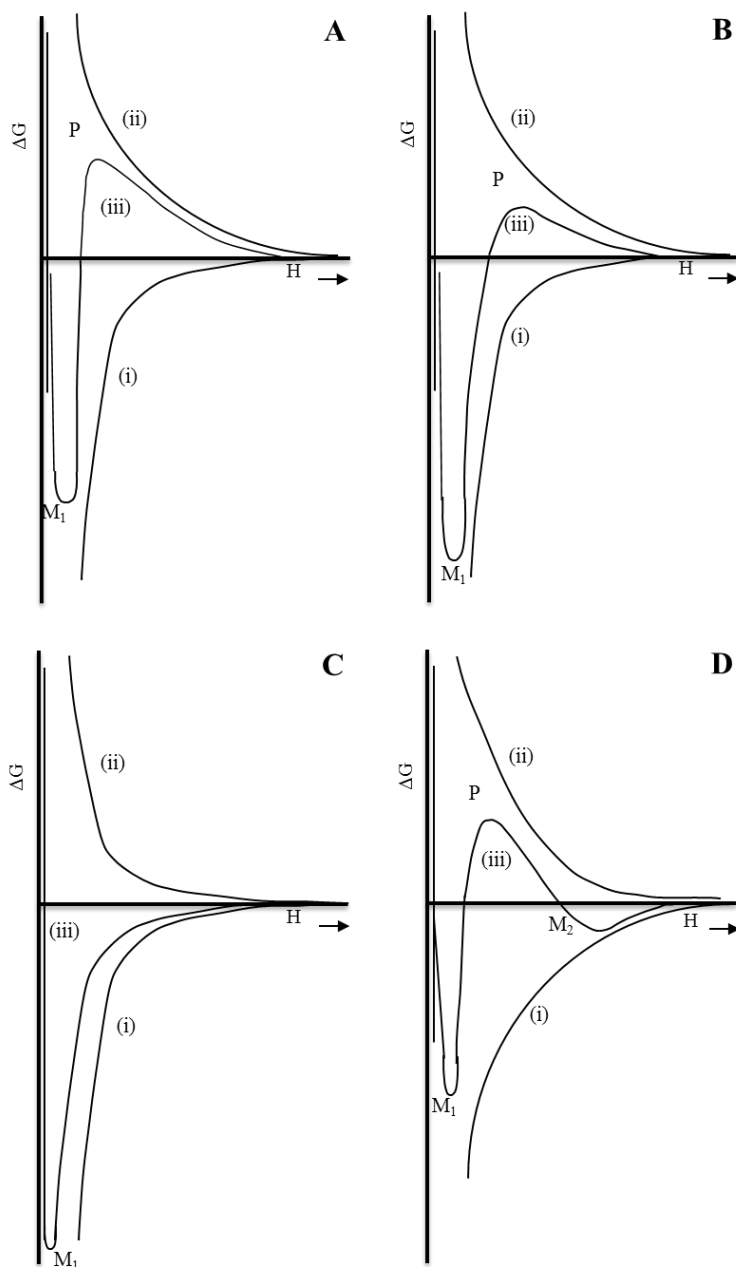


Abbildung 7: Schematische Darstellung von vier Potentialverläufen.

Aus den Kurven der anziehenden (i) und abstoßenden (ii) Wechselwirkungen ergeben sich Kurven der gesamten freien Wechselwirkungen (iii). In Abbildung 7A ist eine Situation veranschaulicht, in der stark abstoßende Wechselwirkungen vorliegen. Diese führen dazu, dass ein Maximum P entsteht, also eine hohe Energiebarriere zwischen

2. Theoretische Grundlagen

Kontakt und Trennung der Teilchen. Die Dispersion ist somit stabil. In Diagramm 7B ist ebenfalls ein Maximum P vorhanden, allerdings ist diese Energiebarriere nur so schwach ausgeprägt, dass diese leicht überwunden werden kann und das System zum stabilen Minimum M1 übergeht. Dies bedeutet, dass das System nicht stabil ist und es zur Ausflockung der Partikel kommt. In Diagramm 7C liegt keine Energiebarriere mehr vor, und das System kann ohne Aufbringung von Aktivierungsenergie in das stabile Minimum M1 übergehen. Auch dieses System ist nicht stabil. Diagramm 7D zeigt ein teilkoaguliertes, kolloidales System. Zwar ist eine hohe Energiebarriere vorhanden, allerdings auch ein zusätzliches Minimum M2, so dass die Teilchen auch in diesem Minimum verharren können. Dies führt zu erhöhter Viskosität der Dispersion und oftmals zu reversibler Flockenbildung.^[27]

2.3 Adsorption und Desorption

Adsorptions- und Desorptionsprozesse sind physikalische oder chemische Grenzflächenprozesse.^[28] Sie finden an der Grenzfläche zwischen der Oberfläche eines Feststoffs und dem umgebenden Gas oder der umgebenden Flüssigkeit statt. Dabei kann das Teilchen in dem umgebenden Medium (Adsorptiv) an die Oberfläche des Feststoffes (Adsorbens) adsorbieren und dort aufgrund von physikalischen oder chemischen Prozessen adsorbiert verbleiben (Adsorbat) oder wieder desorbieren.^[29] Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 8 schematisch veranschaulicht.

2. Theoretische Grundlagen

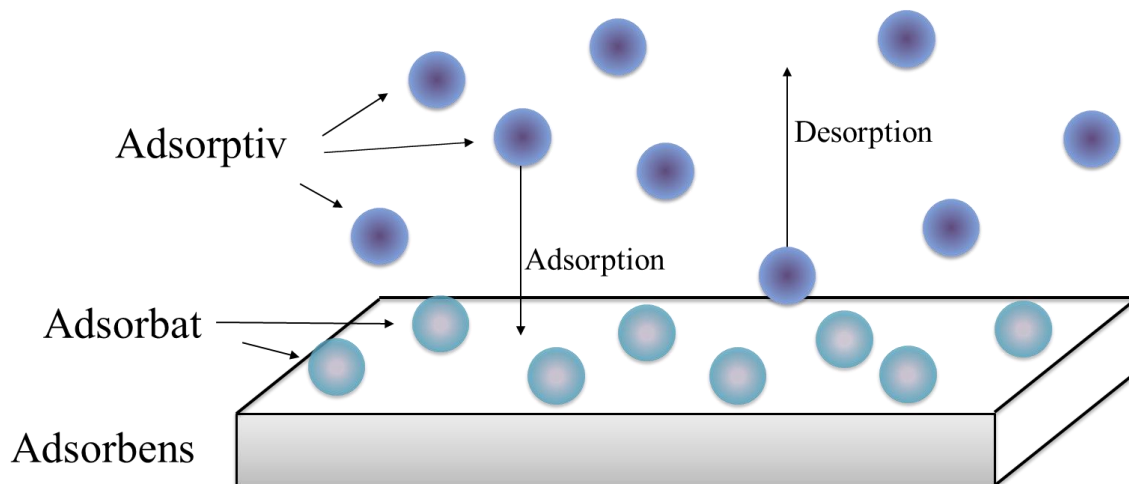


Abbildung 8: Darstellung der Begriffsdefinitionen und Vorgänge während der Adsorption.

Unter Adsorption versteht man die Anreicherung eines Feststoffs mit Molekülen aus der Fluidphase oder Gasphase. Dabei kann diese Anreicherung entweder nur aufgrund von physikalischen Wechselwirkungen oder durch Ausbildung von chemischen Bindungen zu Stande kommen. Die Adsorption aufgrund von physikalischen Wechselwirkungen nennt man Physisorption. Dabei werden die Moleküle nicht durch chemische Bindungen an die Oberfläche des Feststoffs adsorbiert, sondern durch relativ schwache van-der-Waals-Wechselwirkungen. Van-der-Waals-Kräfte besitzen eine relativ große Reichweite, sind aber relativ schwach. Bei der Physisorption verbleibt das Adsorbat unversehrt und wird lediglich aufgrund der Anwesenheit der Oberfläche etwas verzerrt.^[30]

Werden bei der Adsorption von Molekülen chemische Bindungen ausgebildet, so spricht man von Chemisorption. Durch die Ausbildung von zumeist kovalenten Bindungen können die adsorbierten Moleküle zerstört werden, jedoch können reaktive Teilfragmente zurückbleiben. Dieser Zusammenhang wird in der Oberflächenkatalyse genutzt. Die Chemisorption muss aufgrund der Absenkung des Entropiebeitrags immer exotherm verlaufen, damit der Prozess spontan abläuft, sprich die freie Enthalpieänderung negativ ist. Es gibt nur wenige Ausnahmen, bei denen die Chemisorption endotherm verläuft, z. B. die Adsorption von Wasserstoff auf Glas, bei der das Wasserstoffmolekül während der Adsorption in zwei Atome dissoziiert und somit einen Entropiezuwachs zur Folge hat, so dass die Zunahme der Enthalpie kompensiert werden kann.

Man unterscheidet Physisorption und Chemisorption mittels der Enthalpieänderung bei der Adsorption. Enthalpieänderungen bis -25 kJ mol^{-1} können der Physisorption zugeordnet werden, Werte ab -40 kJ mol^{-1} der Chemisorption.^[29] Da die adsorbierten

2. Theoretische Grundlagen

Teilchen untereinander wechselwirken, können während der Adsorption Mono- oder Multilagen entstehen. Deren Bildung ist mit unterschiedlichen Adsorptionsenthalpien verbunden und hängt vom Bedeckungsgrad der Oberflächen ab. Stoßen sich die Teilchen an der Oberfläche gegenseitig ab (z. B. CO an Pd), so adsorbieren diese Teilchen ungeordnet an der Oberfläche, und die Adsorptionsenthalpie wird mit zunehmenden Bedeckungsgrad weniger exotherm. Ziehen sich die Teilchen gegenseitig an (z. B. O₂ an W), so bilden sich auf der Adsorbensoberfläche Inseln von adsorbierten Teilchen, welche bei steigendem Bedeckungsgrad sogar über die Ränder hinaus wachsen können.^[29]

Der Bedeckungsgrad ist somit ein Maß für die Adsorption an Oberflächen. Er ist über die Anzahl der besetzten Adsorptionsstellen N_{besetzt} und die Anzahl der vorhandenen Adsorptionsstellen N_{Gesamt} definiert und kann auch über das Volumen und die Masse ausgedrückt werden.

$$\theta = \frac{N_{\text{besetzt}}}{N_{\text{Gesamt}}} = \frac{V_{\text{ads}}}{V_{\text{Mono}}} = \frac{m_{\text{ads}}}{m_{\text{Mono}}} \quad \text{Gleichung 5}$$

Dabei sind V_{ads} bzw. m_{ads} das Volumen bzw. die Masse des Adsorbats und V_{Mono} bzw. m_{Mono} das Volumen bzw. die Masse des Adsorbats bei Ausbildung einer Monolage.

Bei Adsorptions- und Desorptionsprozessen handelt es sich um Gleichgewichtsreaktionen, wobei der Bedeckungsgrad bei Gasen vom Partialdruck und bei Flüssigkeiten von der Konzentration abhängig ist. Der Verlauf des Bedeckungsgrads kann als Funktion des Drucks bzw. der Konzentration bei konstanter Temperatur dargestellt werden. Dies nennt man Adsorptionsisothermen. Man unterscheidet entweder fünf Typen von Adsorptionsisothermen, welche mittels des BET-Modells (nach BRUNAUER, EMMET und TELLER) beschrieben werden, oder nach IUPAC sechs unterschiedliche Isothermen.^[31]

Die sogenannte Typ-I-Isotherme beruht auf der Beschreibung der Langmuir-Isotherme mit den Annahmen, dass lediglich eine Monolage ausgebildet wird, dass die Oberfläche homogen ist, dass alle Bindungsstellen gleichwertig sind und dass keine Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Adsorbaten auftreten. Dies führt zu einer Isotherme, die gegen einen Grenzwert läuft, welcher auch bei hohen Drücken oder Konzentrationen nicht überschritten wird. Die anderen Isothermen beschreiben Mehrschichtadsorptionen, welche je nach Material des Adsorbens unterschiedlich verlaufen. So zeigen z. B. die Isothermen von Typ I, II und III, dass die Adsorption völlig reversibel verlaufen kann, da das Adsorbens keine Mikroporen (Durchmesser kleiner 2

2. Theoretische Grundlagen

nm) und Mesoporen (Durchmesser 2 bis 50 nm) besitzt. Mesoporen verursachen dahingegen eine Hysterese. Dies bedeutet, dass es zu einer Differenz des Drucks oder der Konzentration bei der Adsorption und der entsprechenden Desorption kommt. Dieser Effekt zeigt sich bei den Isothermen vom Typ IV und V.

3. Geräte und Methoden

3.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotential

Mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung (engl. *Dynamic light scattering*, DLS) kann man zum einen Aussagen über die Größenverteilung von Partikeln im Dispersionsmedium treffen und zum anderen den hydrodynamischen Radius der Partikel bestimmen. Als hydrodynamischen Radius bezeichnet man den Radius der als kugelförmig angesehenen Partikel mit Solvathülle. Bei der dynamischen Lichtstreuung wird die zu untersuchende Probe Lichtimpulsen ausgesetzt. Die Partikel in der Probe bewegen sich zufällig und ungerichtet infolge der Brown'schen Molekularbewegung. Der entsprechende Radius der Partikel lässt sich mit der Stokes-Einstein-Beziehung beschreiben:

$$r = \frac{R T}{N_A 6 \pi \eta D} \quad \text{Gleichung 6}$$

r = hydrodynamischer Radius

R = Gaskonstante

T = Temperatur

N_A = Avogadrokonstante

η = Viskositätskoeffizient

D = Diffusionskoeffizient

Trifft Licht auf Partikel, so streuen diese das Licht in Richtung des Detektors. Bei erneuter Einwirkung des Lichtes auf die sich bewegenden Partikel kann es zur konstruktiven oder destruktiven Interferenz kommen. Dieses führt zu Fluktuationen des Streulichts, welche eine gewisse Zeit lang gemessen werden. Mit der sogenannten Cumulantenmethode berechnet der Zetasizer schließlich den *z-Average*, d. h. die Größenverteilung der Partikel. Der erhaltene Polydispersitätsindex (PDI) liefert eine Aussage über die Dispersität des kolloidalen Systems und gibt den Fehler des *z-Average* an. Liegt der erhaltene PDI zwischen 0 und 0,3, so sind die Partikel noch als monodispers anzusehen. Oberhalb 0,5 sind sie polydispers, d. h. es liegt keine einheitliche Größenverteilung mehr vor.

Das Zetapotential einer kolloidalen Dispersion ist ein Maß für die Stabilität der funktionalisierten Nanopartikel und kann nur indirekt gemessen werden. Dabei wird die

3. Geräte und Methoden

Dispersion in eine Küvette mit Elektroden gegeben, an die eine definierte Spannung angelegt wird. Diese sorgt dafür, dass die geladenen Partikel zur Elektrode der entgegengesetzten Ladung wandern, so dass man ein Strömungspotential erhält. Das Vorzeichen des Zetapotentials entspricht der Ladung des stabilisierenden Teilchens. Für die vorliegende Arbeit wurde mit einem Malvern Zetasizer NanoZS (633 nm Laser) gearbeitet.

3.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (engl. *scanning electron microscopy*, SEM) wird die zu untersuchende Probe zeilenförmig mit einem Elektronenstrahl abgerastert. Der Elektronenstrahl wird mittels einer Glühkathode erzeugt und in Richtung Anode beschleunigt. Die benötigten Spannungen liegen in Bereichen von 8 bis 30 kV. Mit Hilfe eines Linsensystems wird der erzeugte Elektronenstrahl gebündelt und auf die elektrisch leitende Probe fokussiert. Ist die Probe selbst nicht leitfähig, so kann dies unter anderem durch Aufdampfen von Metall (z. B. Gold oder Palladium) erreicht werden.

Ein weiteres Verfahren ist das Sputtern. Dabei werden Elektronen aus den Atomen eines Inertgases herausgeschlagen und dieses somit ionisiert. Es entsteht ein Plasma, welches auf das gewählte Targetmaterial (Platin, Palladium, Gold, Kohlenstoff) geleitet wird, so dass es zum Abtragen von Targetatomen kommt. Diese Atome können die Probe benetzen und die Leitfähigkeit erhöhen. Trifft der Elektronenstrahl auf die Probe, so können die Elektronen zum einen inelastisch gestreut werden (Rückstreuelektronen), zum anderen können Sekundärelektronen aus der Probe emittiert werden. Beide werden schließlich mit Hilfe von Detektoren registriert und in elektrische Signale umgewandelt, so dass ein Hell-Dunkel-Bild entsteht. Mit der Rasterelektronenmikroskopie ist es möglich, Objekte darzustellen, die nur wenige Nanometer groß sind.

Mit der Methode der energiedispersiven Röntgenstrahlung (engl. *energy dispersive X-ray spectroscopy*; EDX) lässt sich die elementare Zusammensetzung einer Probe untersuchen. Dazu wird die beim Beschuss mit Elektronen für jedes Element charakteristische Röntgenstrahlung detektiert. Man erhält ein Spektrum und kann die auftretenden Peaks mit einer Datenbank abgleichen und so den Elementen zuordnen. Die Intensität der Peaks ist dabei proportional zur Menge des Elementes in der vermessenen Probe. Die

3. Geräte und Methoden

abgebildeten REM- und EDX-Aufnahmen wurden mit einem FEI Quanta FEG 400 aufgenommen.

3.3 Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD)

Da die Atomabstände im Kristall im Bereich der Wellenlänge von Röntgenstrahlung liegen, wirken diese für Kristalle wie dreidimensionale Beugungsgitter. Die Beugung von Röntgenstrahlen an Beugungszentren führt zu einer Reflexion der Strahlung an aufeinander folgenden Gitterebenen im Kristall. Bei der Röntgenpulverdiffraktometrie (engl. *X-ray diffraction*, XRD) wird die benötigte Röntgenstrahlung in einer Röntgenröhre erzeugt. Dabei wird die Kathode, oft auch als Filament bezeichnet, erhitzt, so dass Elektronen emittiert werden. Diese werden durch eine angelegte Spannung im Bereich von 30-60 kV in Richtung der wassergekühlten Anode beschleunigt. Es entstehen zwei Arten von Röntgenstrahlung. Zum einen die Bremsstrahlung, die durch das Abbremsen der Elektronen aufgrund der elektrischen Felder zustande kommt, und zum anderen die charakteristische Röntgenstrahlung, die durch Herausschlagen eines Elektrons aus einer Schale unter Ionisierung des Atoms entsteht. Anschließend fällt ein Elektron aus einer höheren Schale zurück in die Lücke, um den instabilen Zustand des Systems auszugleichen, wobei Röntgenstrahlung definierter Wellenlänge entsteht. Die Bremsstrahlung besitzt im Gegensatz zu der charakteristischen Röntgenstrahlung eine kontinuierliche Verteilung, während die charakteristische Röntgenstrahlung je nach Kathodenmaterial, spezifische Signale liefert. Der monochromatisierte Röntgenstrahl wird schließlich auf die feingepulverte Probe gelenkt. Trifft diese unter dem Einfallswinkel θ auf den Kristall, so folgt Reflexion unter dem gleichen Austrittswinkel, wenn die Bragg'sche Gleichung erfüllt ist. Dabei muss die Wegdifferenz der Strahlung einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge entsprechen, damit es zur konstruktiven Interferenz kommt.

$$n \cdot \lambda = 2 d \sin \theta \qquad \text{Gleichung 7}$$

n = Beugungsordnung

λ = Wellenlänge

d = Abstand der Netzebenen

θ = Beugungswinkel

3. Geräte und Methoden

Das erhaltene Diffraktogramm ist charakteristisch für die Probe und kann mit Hilfe von Datenbanken mit Vergleichswerten abgeglichen werden. Bei Nanopartikeln ist eine Reflexverbreiterung zu erkennen. Bei röntgenamorphen Substanzen kommt es zu einer so starken Verbreiterung der Reflexe, dass keine eindeutige Zuordnung der Reflexe mehr möglich ist und die Probe nicht mehr charakterisiert werden kann. Die in der Arbeit gezeigten Röntgenpulverdiffraktogramme wurden mit einem Bruker D8 Advance Pulverdiffraktometer mit Cu K α -Strahlung angefertigt.

3.4 Thermogravimetrie (TG)

Die Thermogravimetrie ist eine Analysemethode, die auf der Messung von Massenänderung bei Temperaturerhöhung beruht. Es wird eine definierte Menge Substanz (wenige mg) in einem Tiegel eingewogen, deren Änderung mit einer sehr empfindlichen Waage bestimmt wird, während der Ofen mit einer definierten Heizrate erhitzt wird. Die Atmosphäre des Ofens kann unterschiedlich gewählt werden. So sind Argon und Stickstoff inert, Sauerstoff wirkt oxidierend und ein Wasserstoff/Luft-Gemisch reduzierend. Mit Hilfe der im Thermogramm enthaltenen Zersetzungsstufen kann man Aussagen über die Zusammensetzung der Probe treffen. Die gezeigten Thermogramme in dieser Arbeit wurden mit dem Gerät STA 449 F3 Jupiter der Firma Netzsch angefertigt.

3.5 Infrarot(IR)-spektroskopie

Bei der Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie) handelt es sich um eine physikalische Messmethode zur qualitativen Analyse von Substanzen. Dabei wird Infrarot-Strahlung mit einem Wellenlängenbereich von 760 nm bis 0,5 mm zur Anregung von Molekülschwingungen verwendet. Dies ist dadurch möglich, dass Licht dieser Wellenlänge im Bereich der Rotationsniveaus von kleinen Molekülen und der Schwingungsniveaus der Molekülbindungen liegt. Die Absorption der elektromagnetischen Strahlung, welche im Infrarot-Spektrum zu sehen ist, führt in den Molekülen somit zu Valenz- und Deformationsschwingungen, welche für den entsprechenden Frequenzbereich und die zugehörige entstandene Schwingung charakteristisch sind. Bei der Anregung von Schwingungen wird das Molekül unter

3. Geräte und Methoden

Absorption eines Lichtquants vom Schwingungsgrundzustand in einen höheren Schwingungszustand überführt. Dabei entspricht der Abstand dieser Energiezustände genau der Energie des Lichtquants, welches absorbiert wurde. Die Absorption von infrarotem Licht ist jedoch nur dann möglich, wenn das Dipolmoment des Moleküls mit dem elektrischen Vektor des Lichtes Wechselwirkungen eingeht. Dies bedeutet, dass sich das Dipolmoment einer Schwingung bei der Anregung ändern muss. Als Folge dieser Auswahlregel ergibt sich, dass alle Schwingungen, die symmetrisch zum Symmetriezentrum des Moleküls ablaufen, verboten sind. Dies bezeichnet man als IR-inaktiv. Alle gezeigten IR-Spektren wurden mit einem ALPHA-Platinum FT-IR-Spektrometer mit ATR-Probenmodul der Firma Bruker angefertigt.

3.6 Elementaranalyse (EA) und Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Die Elementaranalyse diente zur Bestimmung des CHNS-Gehalts der Proben. Dabei handelt es sich um ein Verbrennungsverfahren, bei dem eine definierte Menge der Probe eingewogen und in einem Oxidationsreaktor mit Sauerstoff verbrannt wird. Der in der Probe enthaltene Kohlenstoff reagiert dabei zu Kohlenmonoxid oder Kohlendioxid, Schwefel zu Schwefeldioxid, Stickstoff zu Stickoxiden oder molekularem Stickstoff und Wasserstoff zu Wasser. Die gasförmigen Verbrennungsprodukte werden mit Hilfe eines Trärgases über einen erhitzten Kupferoxidkontakt geführt, so dass die Stickoxide anschließend vollständig als molekularer Stickstoff vorliegen. Zuletzt werden die Gase gaschromatographisch getrennt und mit Hilfe eines Wärmeleitfähigkeitsdetektors quantitativ bestimmt. Die CHNS-Gehalte dieser Arbeit wurden mit einem Analysator Euro EA der Firma Euro Vector bestimmt.

Bei der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) wird die zu untersuchende Probe zunächst in einer Luft-Acetylen-Flamme oder in einem Graphitrohrofen atomisiert. Anschließend wird die Probe mit einem monochromatischen Lichtstrahl bestrahlt. Ein Elektron im Grundzustand kann durch Anregung mit Strahlung bestimmter Wellenlänge und Intensität in den angeregten, aber nicht stabilen, Zustand übergehen. Wenn das Elektron in seinen Grundzustand zurückkehrt, so wird ein Lichtquant der gleichen Wellenlänge und Intensität emittiert, welches mit Hilfe eines Detektors registriert werden kann. Die AAS lässt sich mit dem Gesetz nach Lambert-Beer beschreiben. Dabei wird die gemessene Intensität der unbekannten Probe mit einer Kalibriergeraden abgeglichen und somit die

3. Geräte und Methoden

unbekannte Konzentration bestimmt. Die in dieser Arbeit bestimmten Calciumgehalte wurden mit einem Atomabsorptionsspektrometer der Firma Thermo Electron Corporation M-Serie bestimmt.

3.7 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie ist eine Methode, die auf der Absorption von Licht im ultravioletten (100-200 nm: Vakuum-UV; 200-400 nm: UV) und sichtbaren (400–800 nm) Bereich beruht. Die Intensität I_0 des eintretenden Lichtstrahls wird beim Durchgang durch die Probe durch Absorption abgeschwächt. Durch Einbeziehung der Schichtdicke d der Küvette, der Konzentration c_i der Lösung und dem molaren Extinktionskoeffizienten ε_i erhält man das Lambert-Beersche Gesetz, welches die Absorption mit der Intensität I des austretenden Lichtstrahl und den eben erwähnten spezifischen Parametern in Zusammenhang bringt. Die Absorption führt zu elektronischen Übergängen im Molekül vom Grundzustand in einen angeregten Zustand. Durch die Übergänge und die funktionelle Gruppe wird die jeweilige Lage des Absorptionsmaximums bestimmt. Findet dieser im sichtbaren Bereich statt, so sind die Substanzen farbig (Chromophore), was durch den sogenannten bathochromen Effekt, eine Verschiebung der Absorption zu höheren Wellenlängen bei $n-\pi^*$ - und $\pi-\pi^*$ -Übergängen konjugierter Systeme, hervorgerufen wird. In anorganischen Übergangsmetallverbindungen kann diese Farbigkeit durch Elektronenübergänge innerhalb des Metallatoms hervorgerufen werden (d- und f-Orbitale). Charge-Transfer-Übergänge zwischen zwei Oxidationsstufen eines Metalls (z. B. Berliner Blau) bewirken ebenso eine intensive Färbung. Alle gezeigten UV/Vis-Spektren wurden mit einem Varian Cary 300 Bio UV-Visible Spectrophotometer aufgenommen. Als Küvette diente eine Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm.

3.8 Enzyme linked immunosorbent-Assay (ELISA)

Der ELISA-Assay (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht und somit zu den enzymatischen Immunadsorptionsverfahren gehört. Mittels ELISA lassen sich unter anderem Proteine, Viren, Hormone und Toxine nachweisen. Der Nachweis beruht auf der

3. Geräte und Methoden

Eigenschaft von Antikörpern, spezifisch an den zu untersuchenden Stoff (Antigen) zu binden. Es ist somit eine Antikörper-Antigen-Reaktion.^[32] Bei der hier verwendeten Methode handelt es sich um den sogenannten "Sandwich-ELISA". Dabei wurden zuvor Antikörper auf die Oberfläche der *wells* gebracht und bilden somit die stationäre Phase aus (siehe Punkt I in Abbildung 9). Durch Zugabe des zu detektierenden Proteins wird dieses spezifisch an den Antikörper gebunden (II). Anschließend wird ein Enzym-gekoppelter Antikörper hinzugefügt, welcher erneut spezifisch an das Protein bindet und somit den "Sandwich" ausbildet (III). Durch Zugabe eines chromogenen Substrats erfolgt nach dessen Aktivierung durch das Enzym ein Farbumschlag (IV). Die Farbintensität ist abhängig von der Konzentration des detektierten Allergens und kann mittels Photometrie quantifiziert werden.^[33] Die Ergebnisse, die mittels ELISA erhalten werden, wurden aufgrund der Signifikanz von sieben auf maximal drei Nachkommastellen gerundet. Die ELISA-Assays wurden in Form von FITkits® von der Firma Icosagen bezogen und waren für das jeweilige untersuchte Allergen spezifisch.

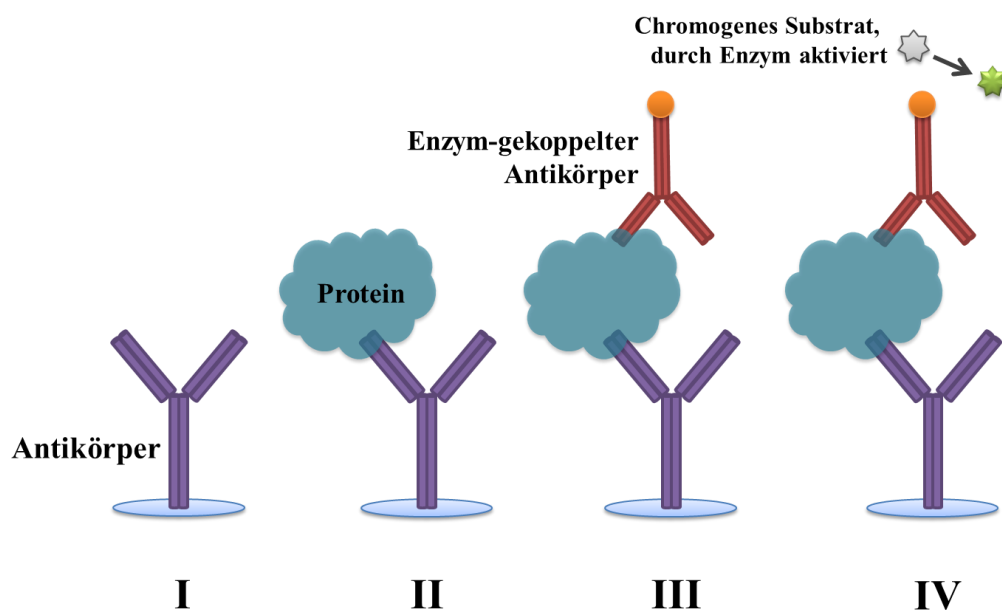


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Sandwich-ELISAs.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Adsorption von Naturlatex-Allergenen an Calciumcarbonat

4.1.1 Calciumcarbonat

Calciumcarbonat (Summenformel: CaCO_3), das Salz der Kohlensäure, ist im Neutralen ein schwerlösliches Salz. Bei 900 °C zersetzt es sich unter Bildung von Calciumoxid und Kohlendioxid.^[34] Ca. 4 % der Erdkruste bestehen aus Calciumcarbonat.^[35] Zudem regelt es den Kohlendioxidgehalt der Atmosphäre durch das Gleichgewicht zwischen mineralisiertem Calciumcarbonat und atmosphärischem Kohlendioxid.^[36] Calciumcarbonat ist ein wichtiger Bestandteil der Papierindustrie, der Medizin, von Farben, in Plastiken, in Lebensmitteln und in Kosmetika.^[35–39] Es existiert in drei wasserfreien, polymorphen Modifikationen. Diese sind Calcit, Aragonit und Vaterit. Die Bildung der Polymorphe ist dabei abhängig des pH-Werts, der Temperatur und des Grads der Übersättigung bzw. der Durchmischung.^[35, 40–42] Die Anwesenheit von Additiven hat Einfluss auf das Kristallwachstum und die Morphologie.^[43–46]

Außerdem sind zwei Hydratphasen und das amorphe Calciumcarbonat bekannt.^[42] Bei den Hydratphasen handelt es sich um Monohydrocalcit, welches trigonal in der Raumgruppe *P31* kristallisiert, und um das Hexahydrat Ikait, welches monoklin in der Raumgruppe *C2/c* kristallisiert. Oberhalb von 60 °C kristallisiert Monohydrocalcit unter Wasserabgabe zu Calcit, einer der drei wasserfreien Modifikationen.^[47] Das Hexahydrat Ikait ist lediglich bei Temperaturen unterhalb von 0 °C stabil.^[48, 49] Bei höheren Temperaturen findet Wasserabgabe statt, und es bildet sich ebenfalls Calcit.

Das amorphe Calciumcarbonat (ACC) kann variierenden Kristallwassergehalt enthalten und ist röntgenamorph, da es lediglich eine Nahordnung, aber keine Fernordnung besitzt.^[50] Als Biomineral ist ACC von Bedeutung.^[51, 52] Es dient in biologischen Systemen zur Calciumspeicherung, in denen das Calcium zum Beispiel während der Häutungsphase aufbewahrt wird.^[53] Des Weiteren bestehen die Schalen von manchen Weichtieren zunächst aus ACC, welches sich anschließend zu Aragonit umwandelt.^[54, 55] Somit dient ACC innerhalb der Biomineralisation als Precursorphase.^[56] Ferner gelingt biologischen Systemen die Stabilisierung von ACC.^[57] So findet man es unter anderem in den Blättern von Pflanzen und in Kombination mit Calcit in Schwämmen.^[53, 58, 59] Durch die Anwesenheit von Magnesium bei der Fällung von ACC entsteht Mg-ACC. Dieses ist

4. Ergebnisse und Diskussion

deutlich stabiler als das additiv-freie ACC, und aufgrund des Additivs wird die weitere Kristallisation zu den stabileren Phasen inhibiert. Mg-ACC gilt als Precursorphase bei der Bildung von Dolomit, $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$.^[60] In Bezug auf ACC ist der Begriff Polyamorphie von Bedeutung. Dies heißt, dass es mehrere Modifikationen des amorphen Calciumcarbonats gibt.^[57]

Nach der Ostwaldschen Stufenregel bildet sich bei der Kristallisation von Calciumcarbonat das amorphe Calciumcarbonat als erste Phase. Die Ostwaldsche Stufenregel besagt, dass ein System, welches mehrere Energiezustände besitzt, nicht gleich in den energieärmsten Zustand übergeht, sondern dass das System zunächst den energiereicheren Zustand bildet. Bei der Bildung von Calcit wäre der energiereichere Zustand dementsprechend das amorphe Calciumcarbonat, welches im wässrigen Medium anschließend zum energieärmsten Zustand, nämlich Calcit, kristallisiert.^[61, 62] Calcit ist somit die thermodynamisch stabilste Phase bei Normalbedingungen (25 °C, 1013 hPa).^[63] Die anderen beiden wasserfreien Phasen sind metastabile Phasen des Calciumcarbonats. Calcit kristallisiert trigonal in der Raumgruppe *R3c*. In Abbildung 10A ist die hexagonale Elementarzelle von Calcit abgebildet. Calcit ist eines der Skalenminerale nach Mohs und besitzt eine Mohs'sche Härte von drei. Damit liegt es zwischen Gips und Fluorit und ist mit einer Kupfermünze leicht ritzbar. Außerdem lassen sich Calcit-Kristalle entlang einer {104}-Fläche spalten. Der Grund dafür sind die schwachen Kräfte, die entlang dieser Flächen wirken. Calcit ist zudem ein sehr häufiges Biomineral. So kommt es zum Beispiel in Stacheln von Seeigeln, Schalen von Mollusken (Weichtieren) und in Marinen Einzellern (Kalkalgen) vor, die einen Calcit-Panzer besitzen.^[37, 64] In der Natur findet man es unter anderem in Tropfsteinhöhlen und als Kalkstein.^[25]

4. Ergebnisse und Diskussion

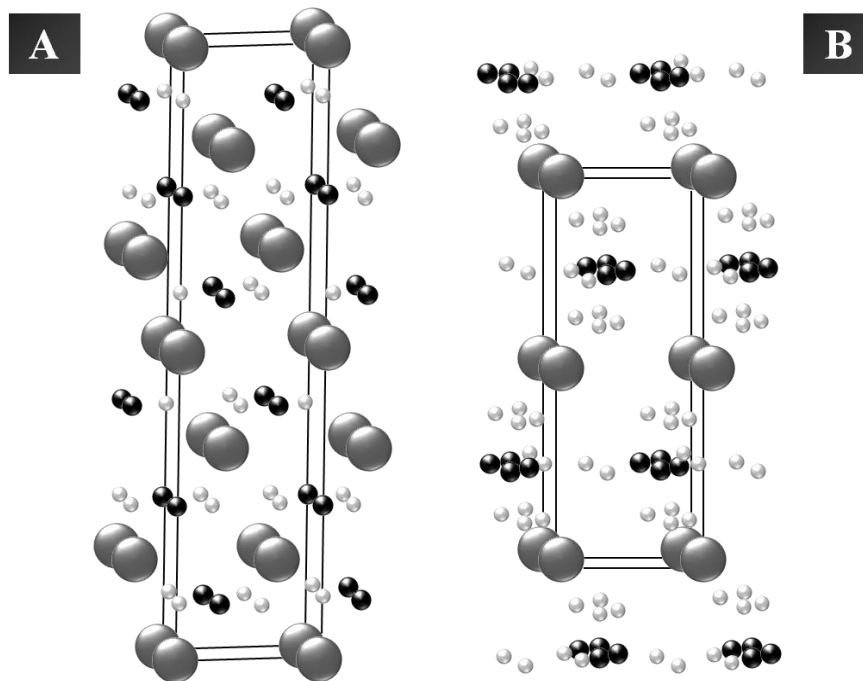


Abbildung 10: Elementarzellen von Calcit (A) und Vaterit (B). Kohlenstoff ist schwarz dargestellt, Sauerstoff hellgrau und Calcium grau.^[65]

Vaterit ist eine thermodynamisch instabile Phase des Calciumcarbonats. Bei Temperaturen unterhalb von 10 °C existiert es metastabil, bei höheren Temperaturen findet die Kristallisation zu Calcit statt.^[66] Dabei findet die Transformation von Vaterit zu Calcit als Zwei-Stufen-Prozess statt. Im ersten Schritt wird das instabile Polymorph aufgelöst, so dass im zweiten Schritt das stabile Polymorph gebildet werden kann.^[67] Bei trockener Lagerung ist Vaterit bis ungefähr 400 °C stabil, bei Anwesenheit von Wasser kristallisiert es jedoch zu Calcit oder Aragonit um, welches wesentlich stabiler als Vaterit ist, obwohl es sich ebenfalls um eine metastabile Phase handelt. Vaterit kristallisiert hexagonal in der Raumgruppe $P6/mmc$. In Abbildung 10B ist die Elementarzelle von Vaterit dargestellt. Vaterit ist sowohl in der Natur ein seltenes Mineral als auch ein selten vorkommendes Biomineral. So findet man es in Schalen von Mollusken, in Stacheln und in Gehörsteinchen.^[64, 68, 69]

Aragonit ist ebenfalls eine thermodynamisch instabile Phase des Calciumcarbonats. Es kristallisiert orthorhombisch in der Raumgruppe $Pmcn$. In Abbildung 11 ist die Elementarzelle von Aragonit abgebildet. Obwohl Aragonit eine metastabile Phase ist, zeigt es keine Neigung zur Umwandlung in die stabilere Phase Calcit, da die zu überbrückende Aktivierungsenergie zu hoch ist. Die hohe Aktivierungsenergie lässt sich damit erklären, dass ein Umbau der Kristallstruktur des Aragonits in die Kristallstruktur

4. Ergebnisse und Diskussion

des Calcits stattfinden müsste. Somit ist Aragonit nur geringfügig instabiler als Calcit. Lediglich bei Anwesenheit eines Lösungsmittels oder bei hohen Temperaturen von ungefähr 400 °C findet eine Umwandlung zu Calcit statt. Anschließend besitzt der so entstandene Calcit je nach Phasenumwandlung unterschiedliche Morphologien. Findet die Umwandlung in Lösung statt, so kristallisiert Calcit in der typischen rhomboedrischen Kristallmorphologie. Bei hohen Temperaturen behält Calcit die ursprüngliche nadelförmige Morphologie des Aragonits bei.

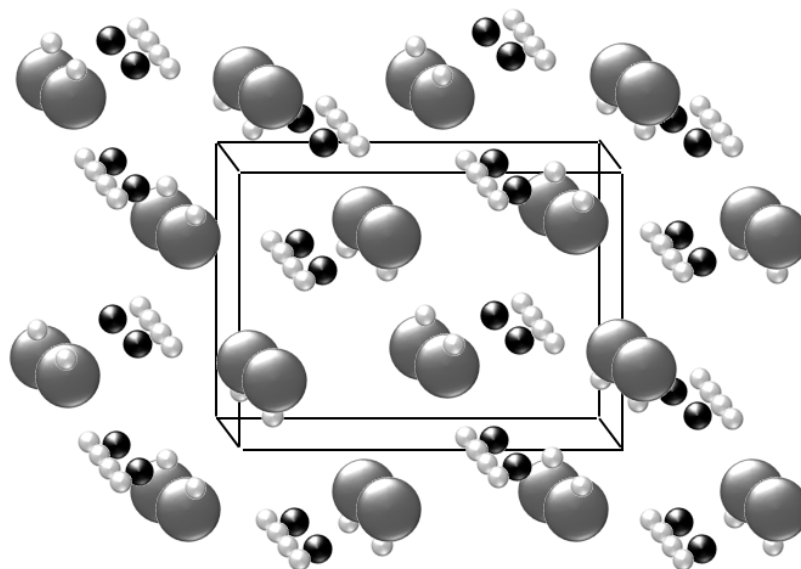


Abbildung 11: Elementarzelle von Aragonit. Kohlenstoff ist schwarz dargestellt, Sauerstoff hellgrau und Calcium grau.^[65]

Aragonit ist neben Calcit das häufigste Biomineral. So findet man es in Schalen von Mollusken, in Korallen und häufig auch in Perlen.^[37, 70]

4.1.1.1 Darstellung und Charakterisierung der polymorphen Calciumcarbonate

4.1.1.1.1 Synthese von Calcit, Aragonit und Vaterit

Die Synthese der polymorphen Calciumcarbonate erfolgte wie in der Literatur beschrieben.^[49] Das Besondere an dieser Syntheseroute war die Möglichkeit, Calcit und Aragonit aus dem zuvor hergestellten Vaterit zu synthetisieren, so dass alle drei Phasen nahezu identische Zusammensetzungen haben sollten.

Für die Darstellung von Vaterit wurden Lösungen von Kaliumcarbonat (2 M) und

4. Ergebnisse und Diskussion

Calciumchlorid-Hexahydrat (2 M) hergestellt. Die Kaliumcarbonat-Lösung wurde in einem 1 L Becherglas mit Magnetrührer auf 30 ± 1 °C temperiert. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe und einem Volumenstrom von 25 mL min^{-1} wurde die Calciumchlorid-Lösung unter starkem Rühren und Temperaturkontrolle zur Kaliumcarbonat-Lösung getropft. Nach einiger Zeit bildete sich eine schlammartige, weiße Masse, welche das Durchmischen der Lösungen stark erschwerte. Bei weiterer Zugabe der Calciumchlorid-Lösung löste sich diese Precursorphase allerdings wieder und es bildete sich ein weißlicher Feststoff. Nachdem die Lösung vollständig zugetropft wurde, wurde der erhaltene Feststoff über einen Büchnertrichter mit einem Whatman-Filter abgesaugt und mit 1 L bidestilliertem Wasser und wenig Aceton p.a. gewaschen. Der Feststoff wurde im Vakuum getrocknet.

Für die Synthese von Calcit erfolgte das Absaugen nicht. Der entstandene Feststoff wurde zusammen mit der Mutterlauge in einen Rundkolben überführt und bei 100 °C für 3 h refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene weiße Feststoff über einen Büchnertrichter mit einem Whatman-Filter abgesaugt, mit ca. 750 mL bidestilliertem Wasser und wenig Aceton p.a. gewaschen und über Nacht im Vakuum getrocknet.

Die Synthese von Aragonit erfolgte ebenfalls von Vaterit ausgehend. Dabei wurden in einem 1 L-Rundkolben 10 g des getrockneten Feststoffs in 500 mL bidestilliertem Wasser suspendiert und diese Mischung bei 100 °C für 2 h refluxiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Feststoff ebenfalls über einen Büchnertrichter mit Whatman-Filter abgesaugt und mit 1 L bidestilliertem Wasser und wenig Aceton p.a. gewaschen. Der erhaltene weiße Feststoff wurde über Nacht im Vakuum getrocknet. Die getrockneten Feststoffe wurden für weitere Arbeiten in einem geschlossenen Gefäß unter Luftatmosphäre aufbewahrt.

4.1.1.1.2 Charakterisierung von Calcit, Aragonit und Vaterit

In Abbildung 12 sind die REM-Aufnahmen der Calciumcarbonatpolymorphe abgebildet. In Abbildung 12A und 12B lässt sich die rhomboedrische Morphologie des Calcits erkennen. Die Kantenlänge der Rhomboeder liegt zwischen $3 \mu\text{m}$ und $10 \mu\text{m}$. Die Abbildungen 12C und 12D zeigen die typischen nadelförmigen Strukturen des Aragonits in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die Kantenlänge der Nadeln beträgt ca. $50 \mu\text{m}$, der Durchmesser ca. $10 \mu\text{m}$. Die kugelförmige Morphologie in Abbildung 12E und 12F lässt

4. Ergebnisse und Diskussion

sich Vaterit zuordnen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die ungefähr 1 μm bis 5 μm großen Kugeln aus weiteren Kugeln mit einer Größe von wenigen Nanometern aufgebaut sind.

4. Ergebnisse und Diskussion

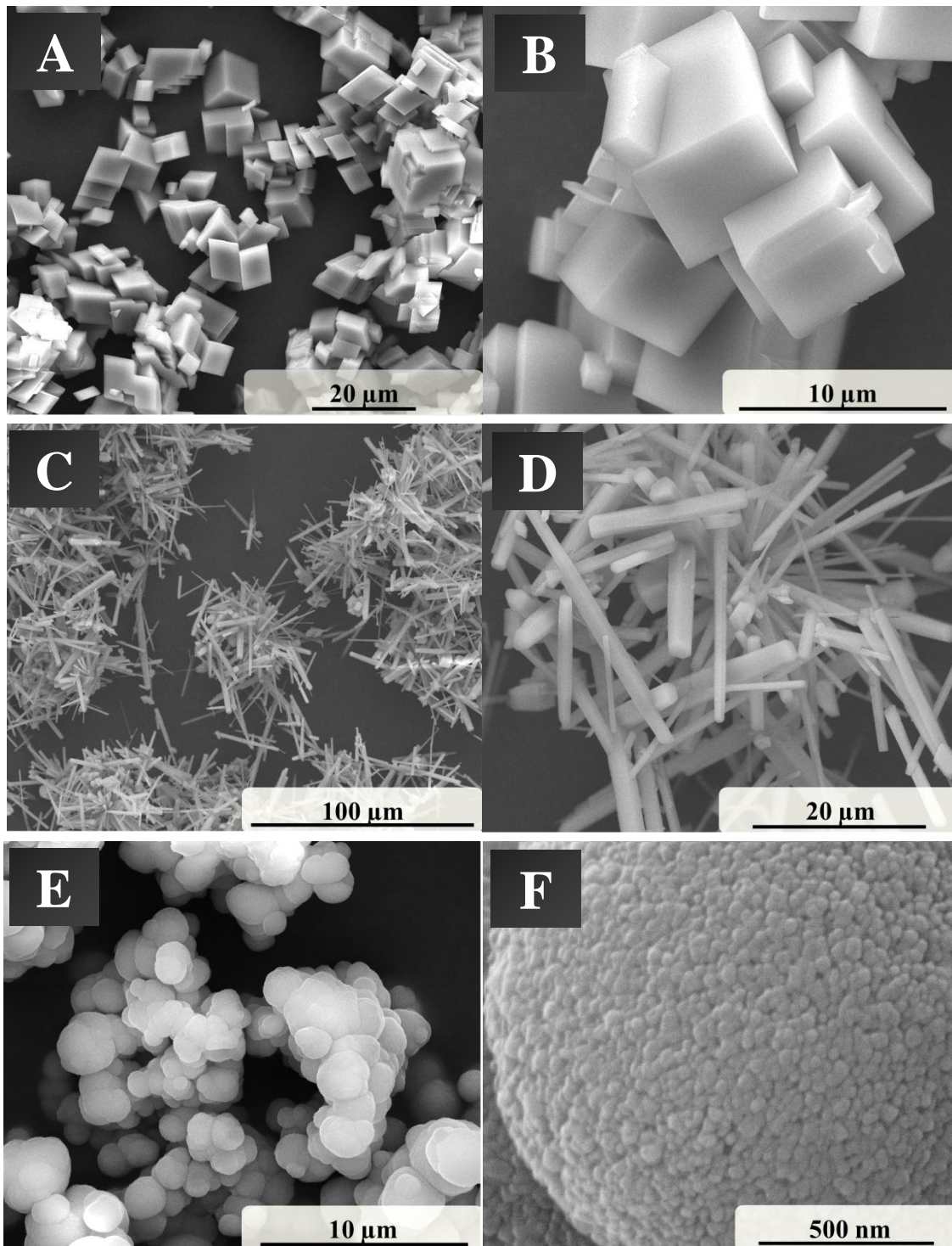


Abbildung 12: REM-Aufnahmen der selbst dargestellten polymorphen Calciumcarbonat-Phasen. **A** und **B** zeigen rhomboedrischen Calcit, **C** und **D** nadelförmigen Aragonit, **E** und **F** kugelförmigen Vaterit.

Die Phasenreinheit der Calciumcarbonatproben wurde mittels Röntgenbeugung nachgewiesen. In Abbildung 13 sind die Diffraktogramme der Polymorphe mit den zugehörigen Literaturreflexen abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass es sich bei den

4. Ergebnisse und Diskussion

Proben um phasenreinen Calcit (Abbildung 13A), phasenreinen Aragonit (Abbildung 13B) und phasenreinen Vaterit (Abbildung 13C) handelt. Die Literaturreflexe lassen sich den Referenzen 01-083-0577 (Calcit), 01-076-0606 (Aragonit) und 01-072-0506 (Vaterit) zuordnen.

4. Ergebnisse und Diskussion

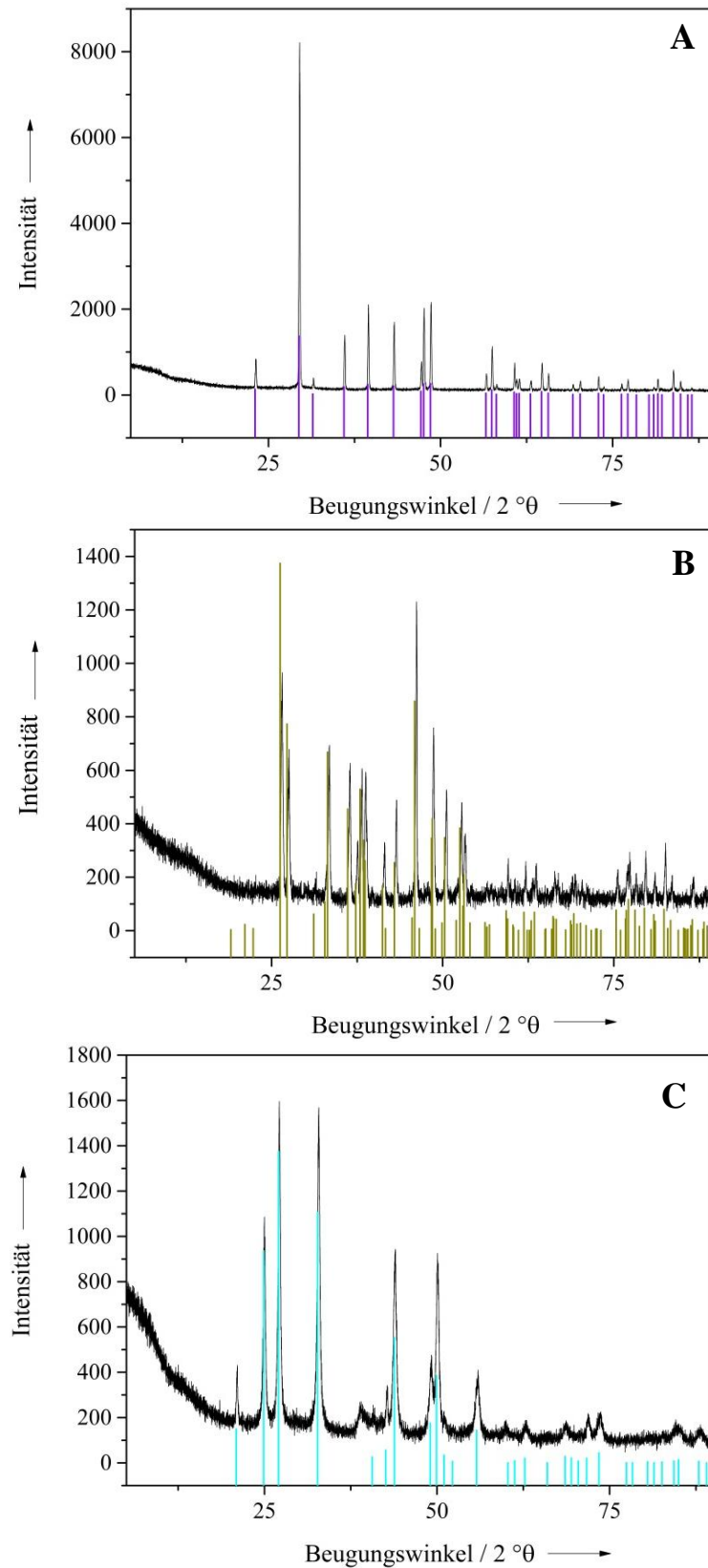


Abbildung 13: Pulverdiffraktogramme der selbst hergestellten Proben. Die lilafarbenen Banden zeigen die Literaturreflexe von Calcit (A), die grünen die von Aragonit (B) und die hellblauen die von Vaterit (C).

4. Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Elementaranalyse und der Atomabsorptionsspektroskopie dargestellt. In allen drei Proben entsprechen die gefundenen Werte für Calcium, Kohlenstoff und Sauerstoff nahezu den theoretischen Werten. Zudem konnte Wasserstoff nachgewiesen werden. Der Gehalt an Wasserstoff ist für Aragonit und Calcit kleiner als 0,1 Gew.-%. Dies ist auf restliche Feuchtigkeit im Feststoff zurückzuführen. Der Wasserstoffgehalt im Vaterit ist mit $0,245 \pm 0,007$ Gew.-% deutlich höher. Dies lässt sich mit dem Kristallwachstum erklären. Die Precursorphase von Vaterit ist ACC, welches variablen Kristallwassergehalt besitzt. Die Kristallisation zu Vaterit erfolgt in kürzester Zeit, und eine weitere Kristallisation zur thermodynamisch stabileren Phase wird durch Zusatz von Aceton inhibiert. Der Abbruch der Kristallisation hat zur Folge, dass möglicherweise ACC nicht vollständig zu Vaterit kristallisiert ist, und es somit zu Einschlüssen von Wasser gekommen ist. Diese Erklärung wird auch durch das Pulverdiffraktogramm von Vaterit belegt (Abbildung 3A), welches im Vergleich zu den anderen beiden Phasen eine leichte Reflexverbreiterung aufweist. Berechnet man aus den Daten für Wasserstoff den Anteil an Wasser im Vaterit, so erhält man $1,96 \pm 0,06$ Gew.-% Wasser.

Tabelle 2: Elementaranalytische Daten der selbst dargestellten polymorphen Calciumcarbonat-Phasen sowie die theoretischen Werte für die reinen Phasen (Summenformel: CaCO_3).

CaCO_3	Ca gefunden / %	C gefunden / %	O berechnet / %	H gefunden / %
Aragonit	$41,3 \pm 0,1$	$12,13 \pm 0,04$	$46,46 \pm 0,13$	$< 0,1$
Vaterit	$38,7 \pm 0,1$	$11,97 \pm 0,01$	$49,05 \pm 0,08$	$0,245 \pm 0,007$
Calcit	$41,5 \pm 0,34$	$12,16 \pm 0,01$	$46,29 \pm 0,37$	$< 0,1$
Theoretisch	40,04	12,00	47,95	0,00

In Abbildung 14 sind die thermogravimetrischen Messungen der drei Polymorphe grafisch dargestellt. Es wird ersichtlich, dass sowohl Calcit als auch Aragonit nur eine Zersetzungsstufe, beginnend bei ungefähr 550°C , besitzen. Dieser Masseverlust von ca. 43 Gew.-% lässt sich dem Kohlendioxidverlust zuschreiben, welcher theoretisch 44,01 Gew.-% betragen sollte.

4. Ergebnisse und Diskussion

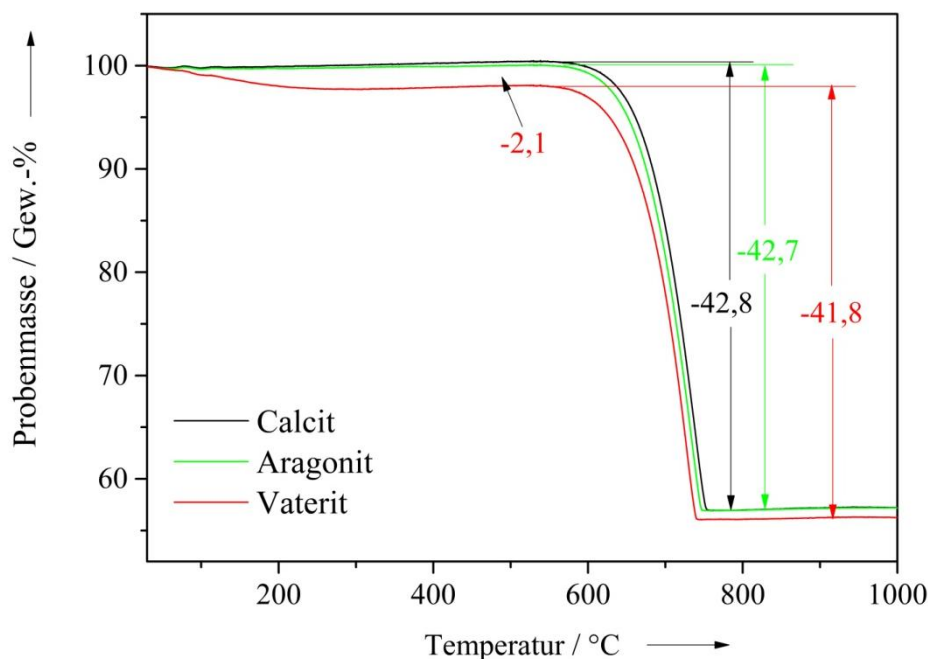


Abbildung 14: TG-Kurven von Calcit (schwarz), Aragonit (grün) und Vaterit (rot). Die Messungen wurden von 25 °C bis 1000 °C unter Sauerstoffatmosphäre bei einer Heizrate von 2 K min⁻¹ durchgeführt.

Der Massenverlust von Vaterit teilt sich in zwei Zersetzungsstufen auf. Zunächst die Stufe, die den Verlust von adsorbierten Wasser und Kristallwasser wiedergibt. Dieser Verlust beläuft sich auf 2,1 Gew.-% und ist somit vergleichbar mit dem mittels Elementaranalyse ermittelten Wert. Der Verlust von Kohlendioxid ist bei Vaterit mit 41,8 Gew.-% gegenüber den anderen beiden Polymorphen leicht erniedrigt, was auf die Anwesenheit von Kristallwasser zurückgeführt werden kann.

Aus den elementaranalytischen und thermogravimetrischen Daten lassen sich die Zusammensetzungen der drei Polymorphen bestimmen. Für Calcit ergibt sich eine Zusammensetzung von $\text{Ca}_1(\text{CO}_3)_{0,94}$, für Aragonit von $\text{Ca}_1(\text{CO}_3)_{0,94}$ und für Vaterit von $\text{Ca}_1(\text{CO}_3)_{1,08} \cdot 0,11 \text{ H}_2\text{O}$. Es wird deutlich, dass die Zusammensetzungen von Aragonit und Calcit, den beiden Proben ohne Kristallwasser, identisch sind. Dies lässt sich mit der Darstellungsweise der Partikel erklären. Da als Ausgangsphase Vaterit verwendet und aus diesem im Anschluss, je nach gewählten Parametern, Aragonit bzw. Calcit dargestellt wird, lässt sich die identische Zusammensetzung damit erklären, dass als Edukt die gleiche Precursorphase gewählt wurde. Dies ist vor allem für die im Folgenden gezeigten lösungskalorimetrischen Messungen von Vorteil, da sich die Stöchiometrie der Phasen nicht ändert und somit eine bessere Vergleichbarkeit vorliegt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1.1.2 Darstellung und Charakterisierung von amorphem Calciumcarbonat

4.1.1.2.1 Synthese von amorphem Calciumcarbonat

Die Synthese von amorphem Calciumcarbonat erfolgte wie in der Literatur beschrieben.^[61] Dazu wurden eine Calciumchlorid-Lösung (0,1 M) und eine Kaliumcarbonatlösung (0,1 M) mit bidestilliertem Wasser hergestellt und für mehrere Stunden oder über Nacht im Kühlschrank auf 5 °C temperiert. Das zur Inhibition der Kristallisation benötigte Aceton (800 mL, p.a.) wurde ebenfalls auf 5 °C temperiert. Zur Fällung des amorphen Calciumcarbonats wurden je 250 mL der Lösungen unter Rühren vereinigt und die Kristallisation durch sofortige Zugabe von 400-500 mL Aceton inhibiert. Der erhaltene Feststoff wurde schnell über einem Büchnertrichter mit zweilagigem Weißband-Filterpapier abgesaugt. Währenddessen erfolgte eine weitere kontinuierliche Zugabe von Aceton. Der Feststoff wurde nochmals mit dem restlichen Aceton gewaschen und im Büchnertrichter getrocknet. Anschließend wurde der erhaltene weiße Feststoff im Vakuum getrocknet und für weitere Arbeiten im Vakuum aufbewahrt.

4.1.1.2.2 Charakterisierung von amorphem Calciumcarbonat

Der amorphe Charakter des gefällten ACC wurde zunächst mittels Röntgenpulverdiffraktometrie überprüft. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, sind im erhaltenen Röntgendiffraktogramm keine scharfen Reflexe zu erkennen, so dass kein kristalliner Anteil einer weiteren Calciumcarbonat-Phase nachgewiesen werden konnte.

4. Ergebnisse und Diskussion

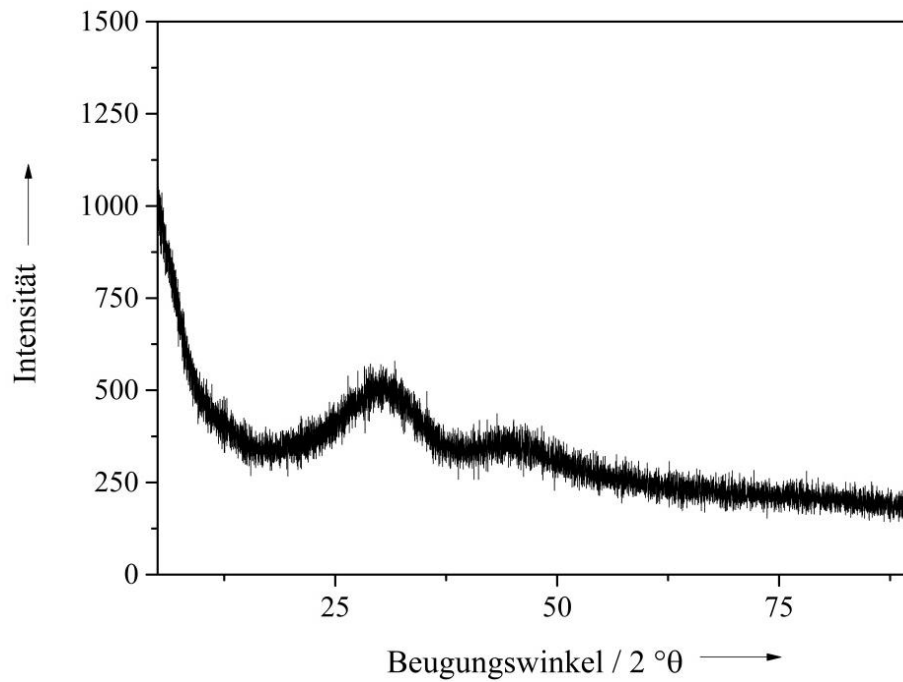


Abbildung 15: Pulverdiffraktogramm von ACC.

Zur weiteren Charakterisierung des ACC wurde ein Thermogramm angefertigt. Der Massenverlust ist in Abbildung 16 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass ACC beim Erhitzen bis 1000 °C zwei Stufen an Massenverlust durchläuft. Zum einen die erste Stufe von 80 °C bis 400 °C, welche dem Wasserverlust der Probe zugeordnet werden kann. Zum anderen ist der Kohlendioxidverlust in der zweiten Stufe ersichtlich. Dieser beträgt 35,29 % und liegt deutlich unter dem erwarteten Wert von 44,01 Gew.-%.

4. Ergebnisse und Diskussion

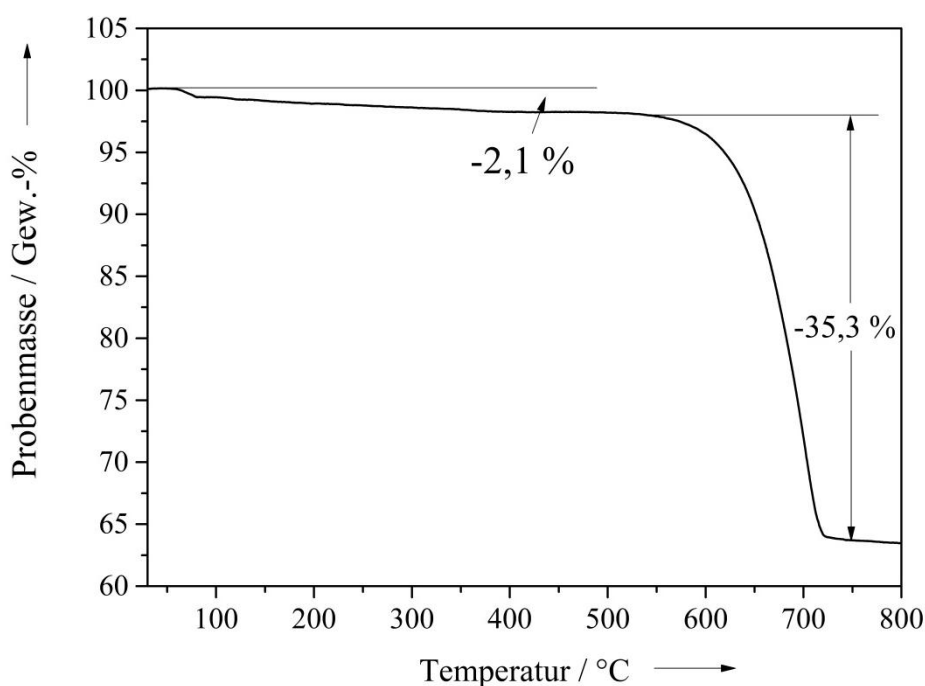


Abbildung 16: Thermogramm von ACC. Die Messung erfolgte von 30 °C bis 1000 °C unter Sauerstoffatmosphäre bei einer Heizrate von 2 K min⁻¹.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen aus der Elementaranalyse (Tabelle 3), so lässt sich feststellen, dass es gerade beim Wassergehalt zu deutlichen Abweichungen kommt. Berechnet man den Anteil an Wasser in der Probe, so erhält man $7,11 \pm 1,71$ %. Dieser Wert zeigt deutliche Abweichungen von dem mittels Thermogravimetrie bestimmten Wert. Ausgehend vom Anteil an Calcium lässt sich der gesamte Anteil an Calciumcarbonat berechnen. Dieser beträgt $91,58 \pm 0,88$ %. Rechnet man in diesem Anteil den Kohlenstoffanteil aus, so erhält man $10,99 \pm 0,11$ % Kohlenstoff. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem mittels EA bestimmten Wert überein. Die Summe aus Calciumcarbonat und Wasser beläuft sich auf $98,69 \pm 2,59$ % und entspricht, unter Einbeziehung des Fehlers der Methode, den Erwartungen.

Tabelle 3: Daten der EA und AAS bei der Bestimmung von ACC, sowie die theoretisch erwarteten Werte für Calciumcarbonat.

CaCO ₃	Ca gefunden / %	C gefunden / %	O gefunden / %	H gefunden / %
ACC	$36,65 \pm 0,35$	$11,20 \pm 0,23$	$49,25 \pm 0,21$	$0,78 \pm 0,19$
Theoretisch	40,04	12,00	47,95	0,00

4. Ergebnisse und Diskussion

Des Weiteren lässt sich aus den thermogravimetrischen und elementaranalytischen Daten die Zusammensetzung des ACC bestimmen. Diese lautet $\text{Ca}_1(\text{CO}_3)_{0,88} \cdot 0,12 \text{ H}_2\text{O}$ mit dem Wassergehalt, der mittels TG bestimmt wurde. Mit dem Wassergehalt laut EA erhält man $\text{Ca}_1(\text{CO}_3)_{0,88} \cdot 0,39 \text{ H}_2\text{O}$. Diese unterschiedlichen Summenformeln für ACC spiegeln den variablen Kristallwassergehalt wieder, der sogar innerhalb einer Probe deutliche Abweichungen zeigt. Zudem ist die Ladungsbilanz aufgrund des geringen Anteils an Carbonat in den berechneten Summenformeln nicht ausgeglichen, so dass möglicherweise weitere Anionen, wie z. B. Hydroxid-Ionen, diese ausgleichen.

Die Morphologie von ACC wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie überprüft. Die REM-Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerungen sind in Abbildung 17A und 17B zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine homogene Größenverteilung der kugelförmigen Partikel vorliegt. Die durchschnittliche Größe der Partikel beträgt 50 nm.

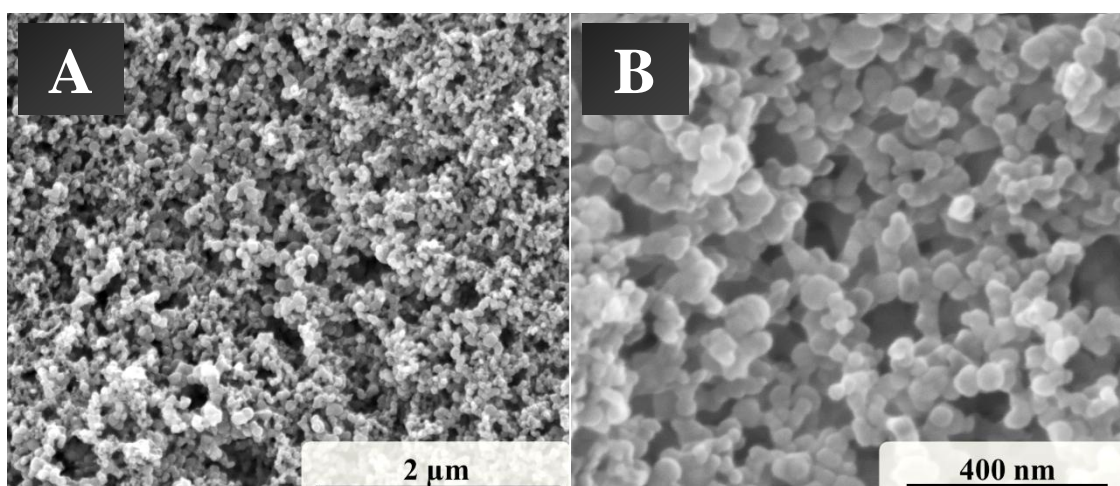


Abbildung 17: REM-Aufnahmen von ACC in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen.

4.1.1.3 Untersuchungen zur Lösungsenthalpie der polymorphen Calciumcarbonate und von amorphem Calciumcarbonat

Zur Bestimmung der Lösungsenthalpie der polymorphen Calciumcarbonate Calcit, Aragonit und Vaterit (Synthese und Charakterisierung in Abschnitt 4.1.1.1) sowie ACC (Abschnitt 4.1.1.2) wurden jeweils etwa 100 mg Feststoff in einer Kapsel aus dünnem Glas mit einer schmalen Öffnung eingewogen. Die Öffnung wurde mit Hilfe von Wachs dicht verschlossen. Zur Messung der Lösungsenthalpie wurde die Kapsel in einen Halter eingespannt und in den Reaktionsbehälter, in welchem sich 100 mL 0,1 M Salzsäure

4. Ergebnisse und Diskussion

befand, eingebracht. Eine schematische Abbildung des Reaktionsbehälters ist in Abbildung 18 zu sehen.

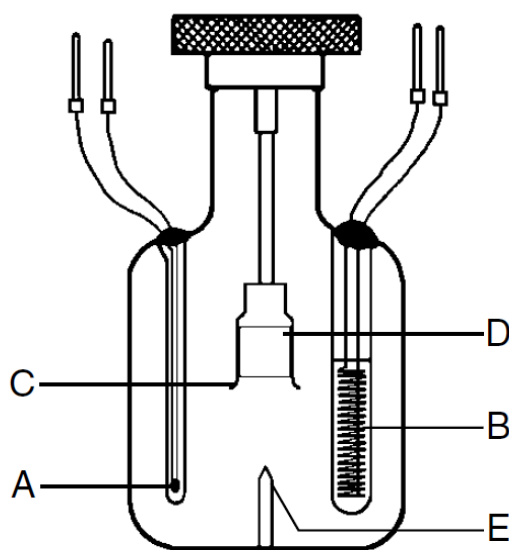


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Reaktionsbehälters für lösungskalorimetrische Untersuchungen. **A** zeigt den Thermostaten, **B** die Heizspirale, **C** den Rührer, in welchem gleichzeitig die Ampulle eingespannt wurde, **D** die Glasampulle und **E** den Saphirstift, der zum Brechen der Ampulle benötigt wurde.^[71]

Die Messung erfolgte mit einem Kalorimeter Thermometric Heto Calibration mit einem Thermometric 214 Thermostat und einem Thermometric 22820TAM Accessory Interface. Zur Aufzeichnung der Messung wurde das Programm Solution Calorimeter Systems Version 1.2 verwendet. In Abbildung 19 ist der Verlauf der Messung am Beispiel von ACC gezeigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

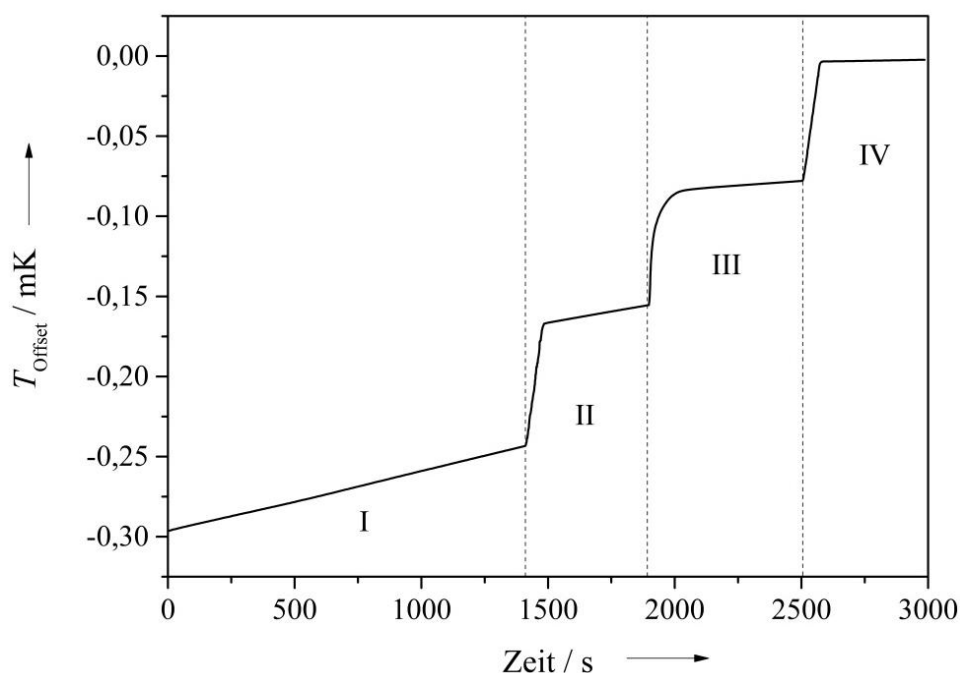


Abbildung 19: Aufzeichnung der lösungskalorimetrischen Messung von ACC.

Da das vorliegende System kein abgeschlossenes, ideal adiabatisches System ist, sondern einem geringen Temperaturanstieg aufgrund von Wechselwirkungen mit der Umgebung unterliegt, was durch den linearen Anstieg der Temperatur verdeutlicht wird, muss vor dem eigentlichen Messbeginn eine Basisline aufgenommen werden (**I**). Anschließend folgt der Beginn der ersten Kalibration (**II**), bei der Wärme in Form von elektrischer Energie an das System abgegeben wird, so dass es zur Temperaturerhöhung kommt und sich anschließend wieder ein konstanter Temperaturanstieg einstellt. Durch das Brechen der Ampulle und dem Auflösen des Calciumcarbonats in der Salzsäure kommt es erneut zu einem Temperaturanstieg und zur anschließenden Relaxation des Reaktionsbehälters mit der Umgebung (**III**). Dabei läuft in dem Reaktor folgende Reaktion ab:



Danach wird das System erneut elektrisch kalibriert (**IV**).

In der nachfolgenden Tabelle 4 sind die gemessenen Daten, Einwaagen und Einzelberechnungen der lösungskalorimetrischen Versuche für Calcit, Aragonit, Vaterit und ACC dargestellt. Die angegebene Größe der Calciumcarbonate ist die durchschnittliche Größe der Partikel, welche aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bestimmt wurde.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4: Einwaagen und Einzelberechnungen der Lösungsenthalpie für die jeweiligen Versuche aller verwendeten Calciumcarbonate. Um eine bessere Vergleichbarkeit von ACC mit den wasserfreien Phasen zu erhalten, wurden die mit * markierten Einwaagen für ACC neu berechnet und das Kristallwasser (laut EA) berücksichtigt.

Nr.	$m(\text{CaCO}_3)/$ mg	$n(\text{CaCO}_3)/$ mol	$n(\text{HCl})/$ $n(\text{CaCO}_3)$	$\Delta T_{\text{ad}}/$ mK	Q/J	$\Delta_r H^0/$ J g^{-1}
Calcit (5 μm)						
1	100,81	0,0010072	9,9	74,507	-33,293	-330,259
2	100,31	0,0010022	10,0	72,295	-32,262	-321,622
3	100,86	0,0010077	9,9	73,174	-32,690	-324,115
4	100,24	0,0010015	10,0	73,645	-32,887	-328,084
Aragonit (30 μm)						
1	100,95	0,0010086	9,9	75,873	-34,05	-337,296
2	100,95	0,0010086	9,9	76,246	-34,11	-337,888
3	100,72	0,0010063	9,9	75,828	-33,956	-337,135
4	100,18	0,0010009	10,0	75,678	-33,857	-337,966
Vaterit (1 μm)						
1	100,08	0,0009999	10,0	80,019	-35,854	-358,252
2	100,64	0,0010055	9,9	79,837	-35,704	-354,773
3	100,78	0,0010069	9,9	80,700	-36,142	-358,627
4	100,78	0,0010069	9,9	81,538	-36,438	-361,560
ACC (50 nm)						
1	93,26*	0,0009318	10,7	69,652	-31,149	-334,006
2	94,92*	0,0009484	10,5	67,061	-29,963	-315,666
3	93,25*	0,0009317	10,7	65,931	-29,466	-315,987
4	94,73*	0,0009465	10,6	68,049	-30,442	-321,355

Aus diesen Daten wurden der Mittelwert der Lösungsenthalpie und auch die Standardabweichung ermittelt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 5 zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5: Werte der Lösungsenthalpie für die vermessenen Polymorphe und ACC mit Angabe der Standardabweichung ($M=100,09 \text{ g mol}^{-1}$).

CaCO_3	$\Delta_r H^0 /$ J g^{-1}	$\Delta_r H^0 /$ kJ mol^{-1}
Calcit	$-326,020 \pm 3,882$	$-32,630 \pm 0,389$
Aragonit	$-337,571 \pm 0,418$	$-33,786 \pm 0,042$
Vaterit	$-358,303 \pm 2,454$	$-35,861 \pm 0,246$
ACC	$-321,754 \pm 8,576$	$-32,203 \pm 0,858$

Stellt man diese Ergebnisse für die einzelnen Calciumcarbonate bezogen auf ihre durchschnittliche Kristallitgröße grafisch dar, so erhält man die in Abbildung 20 gezeigte Verteilung der berechneten Lösungsenthalpien.

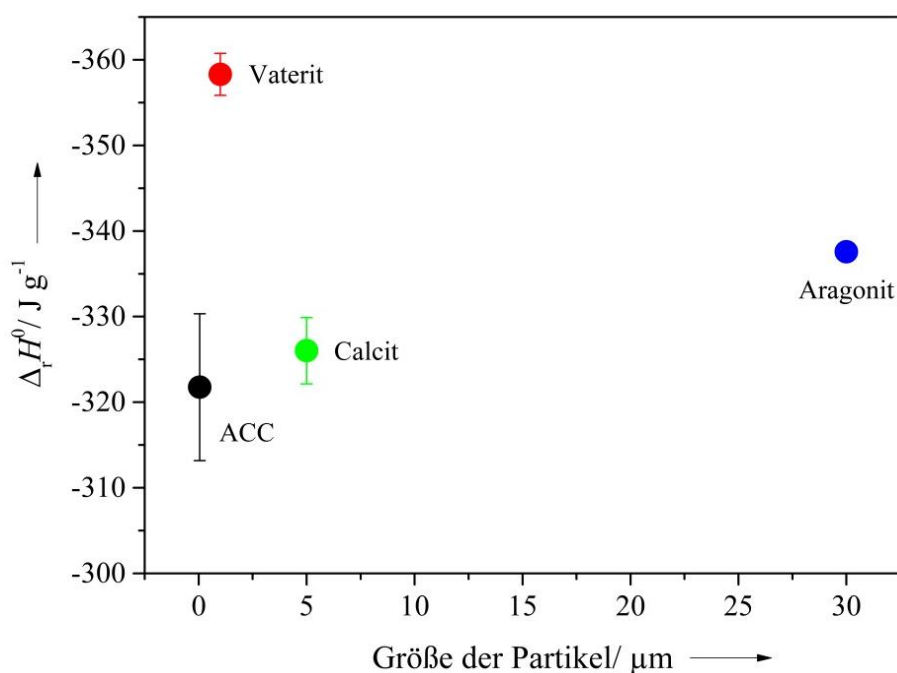


Abbildung 20: Darstellung der Lösungsenthalpie in Bezug auf die durchschnittliche Größe der verwendeten Calciumcarbonate.

Obwohl die durchschnittliche Größe von Aragonit deutlich größer ist als die von Calcit, ist die bestimmte Lösungsenthalpie leicht exothermer. Dies hängt damit zusammen, dass Aragonit eine metastabile Phase des Calciumcarbonats ist. Die ermittelte Lösungsenthalpie von Calcit entspricht den Werten, die in der Literatur zu finden sind.^[41, 72] Wenn man Calcit mit der durchschnittlichen Größe von $5 \mu\text{m}$ als Referenz

4. Ergebnisse und Diskussion

setzt und die Lösungsenthalpien der weiteren Calciumcarbonate als Differenz zu Calcit berechnet, so erhält man folgendes Schema, welches in Abbildung 21 zu sehen ist.^[40]

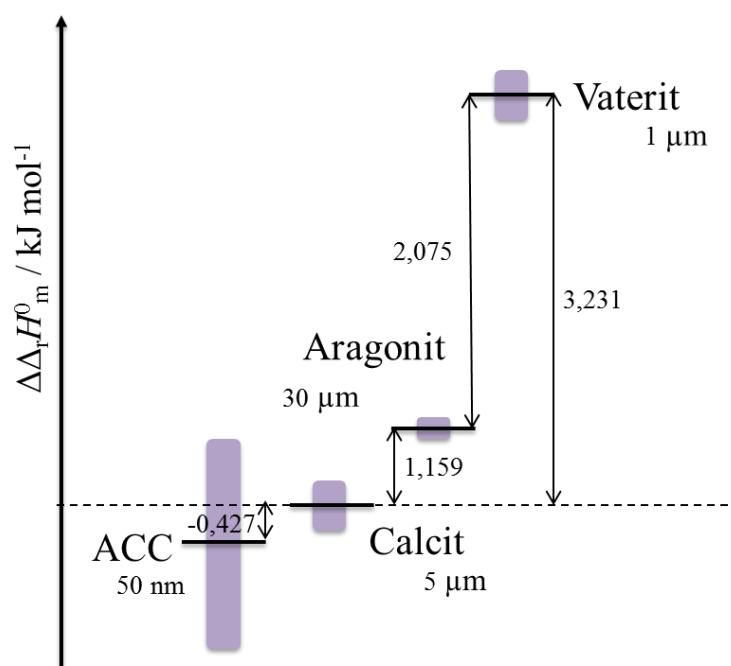


Abbildung 21: Darstellung der Lösungsenthalpiendifferenzen in Bezug auf Calcit mit Angabe des Fehlers (grau).

Berechnet man die Differenz von Aragonit zu Calcit mit den Werten, die in der Literatur angegeben sind, so erhält man eine Differenz von $\Delta\Delta_r H_m^0 = 0,21 \text{ kJ mol}^{-1}$.^[73] Damit ist der experimentell ermittelte Wert von $1,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ deutlich größer. Für die Differenz von Calcit zu Vaterit findet man in der Literatur Werte zwischen $3,1$ und $3,4 \text{ kJ mol}^{-1}$.^[74] Dies entspricht dem ermittelten Wert.

Die bestimmte Lösungsenthalpie von ACC entspricht nicht den Literaturdaten.^[75] Schon aufgrund der geringen Größe der Partikel und der Instabilität von ACC würde man Lösungsenthalpien im Bereich von Vaterit erwarten. Es zeigte sich allerdings, dass ACC im Experiment die geringste Lösungsenthalpie aufwies, welche vergleichbar mit der von Calcit war. In der Literatur findet man für ACC, je nach Größe der Partikel und Kristallwassergehalt, unterschiedliche Werte. Ähnliches ACC wie das hier synthetisierte, lieferte Lösungsenthalpien von $-46,81 \pm 0,85 \text{ kJ mol}^{-1}$.^[75] Dieser Wert ist deutlich negativer als der hier ermittelte Wert. Erklärungen für die Ergebnisse in den lösungskalorimetrischen Experimenten können nur schwer gefunden werden. Möglicherweise ist die Instabilität von ACC eine Begründung für die ermittelten Lösungsenthalpien. ACC ist nur im Vakuum stabil und wandelt sich unter

4. Ergebnisse und Diskussion

Sauerstoffatmosphäre in Calcit um. Zwar wurde das ACC durchgehend unter Vakuum aufbewahrt, musste allerdings für die Messungen in eine dünnwandige Glasampulle eingewogen werden und unter Luftatmosphäre verschlossen und vermessen werden. Die Umwandlung von ACC zu Calcit während dieser Zeit wäre eine mögliche Erklärung für die ermittelten Lösungsenthalpien, die nahezu identisch mit denen von Calcit sind. In Abbildung 22 ist das Diffraktogramm von ACC nach einer Stunde an Luft gezeigt.

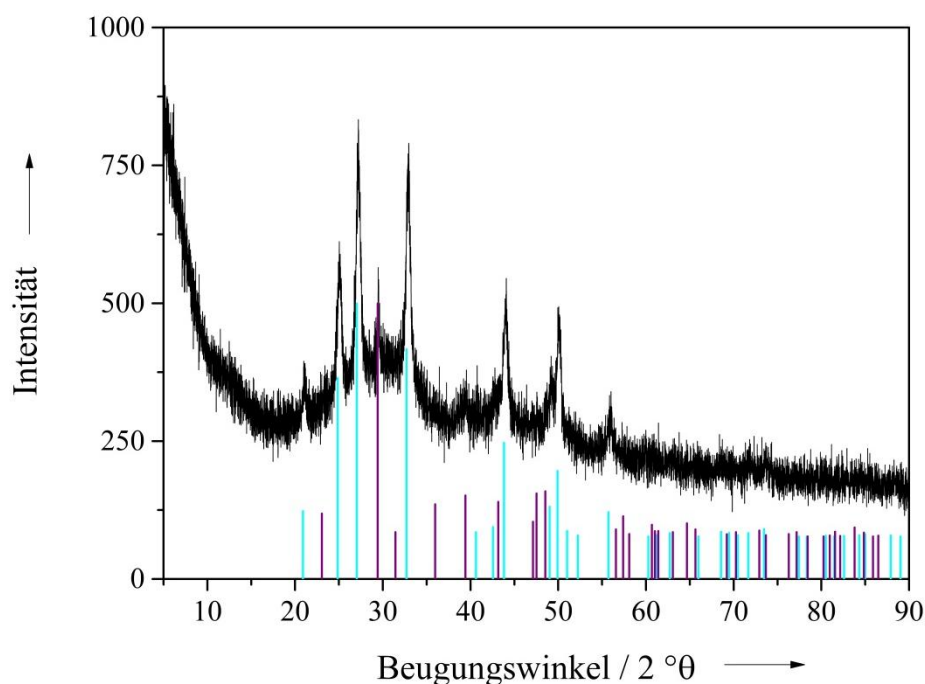


Abbildung 22: Pulverdiffraktogramme von ACC nach einer Stunde unter Luft. Die lilafarbenen Striche zeigen die Literaturreflexe von Calcit und die hellblauen die von Vaterit.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich beim zuvor röntgenamorphen ACC nach einer Stunde unter Luft Reflexe von kristallinen Phasen nachweisen lassen. Neben Vaterit sind auch Reflexe von Calcit zu erkennen. Die Umwandlung kann einen erheblichen Einfluss auf die Ermittlung der Lösungsenthalpie haben und würde somit die zu geringe Lösungsenthalpie von ACC erklären.

Des Weiteren spielt die Stöchiometrie bei der Reaktion eine große Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass das Calcium- zu Carbonat-Verhältnis von ACC, welches berechnete Summenformeln von $\text{Ca}_1(\text{CO}_3)_{0,88} \cdot 0,12 \text{ H}_2\text{O}$ (mit Hilfe TG berechnet) und $\text{Ca}_1(\text{CO}_3)_{0,88} \cdot 0,39 \text{ H}_2\text{O}$ (mittels EA berechnet) besitzt, zwar annähernd 1 ist, allerdings ist der Wassergehalt innerhalb der Probe je nach Bestimmungsmethode verschieden, so

4. Ergebnisse und Diskussion

dass dieser Effekt einen Einfluss auf die kalorimetrischen Messungen haben könnte. Dies zeigt sich auch in dem großen Fehler der bestimmten Lösungsenthalpien.

Die Bildung weiterer Substanzen während der Darstellung von ACC konnte mittels Elementaranalyse ausgeschlossen werden, so dass auch die Anwesenheit dieser und die damit verbundene Erniedrigung der Lösungsenthalpie ausgeschlossen werden kann. Alle Untersuchungsmethoden, die durchgeführt wurden, um ACC zu charakterisieren, zeigen deutlich, dass amorphes Calciumcarbonat synthetisiert wurde, welches phasenrein, also ohne Anwesenheit einer kristallinen polymorphen Phase, dargestellt wurde.

Somit kann an dieser Stelle keine eindeutige Erklärung für die Ergebnisse der Lösungsenthalpie gefunden werden.

Vergleiche der Ergebnisse mit den Enthalpien der Phasenumwandlungen von Aragonit bzw. Vaterit zu Calcit zeigen, dass sowohl die bestimmte Enthalpiedifferenz sowohl für Aragonit als auch für Vaterit mit den hier gefundenen Ergebnissen vergleichbar ist.^[76]

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1.2 Einführung in die Thematik der NRL-Allergene

Natur-Latex (engl. *natural rubber latex*, NRL) wird aus *Hevea brasiliensis*, dem sogenannten Kautschukbaum, gewonnen.^[77] Dabei wird der Latex in drei Teilen des Baums gebildet, in den sogenannten Milchgefäßen, in den Milchröhren und in den Milchzellen. Die Milchgefäße bestehen aus einem vernetzten System von Röhren, in dem ständig neue Zellen gebildet werden. Dabei besitzt ein Baum nicht nur ein solches Milchgefäß, sondern mehrere. Die Milchröhren bestehen aus einem verzweigten Röhrensystem, und die Milchzellen liegen isoliert vor. *Hevea brasiliensis* muss fünf bis sieben Jahre wachsen, bevor er für 25 bis 30 Jahre zur Gewinnung von Latex verwendet werden kann. Dabei erfolgt der Anstich durch einen langen Schnitt in die Baumrinde. Innerhalb von zwei bis fünf Stunden liefert ein Baum je nach Alter und Jahreszeit 50 cm³ Latex, welcher in einem Behälter aufgefangen wird. Der Schnitt verschließt sich durch trocknenden Latex von selbst und bildet einen Latex-Film. Dieser kann nach zwei Tagen entfernt werden und der Baum zur erneuten Gewinnung des Latex verwendet werden. Der gewonnene Latex ist eine 30–38 %ige Dispersion aus Wasser und *cis*-1,4-Polyisopren.^[78] Die Partikelgröße beläuft sich auf 0,15 bis 3 µm und besitzt eine sehr breite Verteilung. Die Latex-Partikel sind umgeben von anionischen Proteinen, welche den Partikeln eine negative Oberflächenladung geben und diese vor Koagulation schützen. Neben dem Naturkautschuk lassen sich noch Fettsäuren, anorganische Salze und weitere Proteine in der Dispersion finden.^[79, 80]

Naturkautschuk wird in vielen alltäglichen Materialien verarbeitet. So werden unter anderem aus flüssigem Latex die sogenannten *dipped products* (Produkte, bei denen Formen in den flüssigen Latex eingetaucht werden) wie Handschuhe, Luftballons und Kondome hergestellt. In getrockneter Form wird Latex z. B. in Schnullern, Flaschendeckeln und Spritzenkolben verwendet.^[80–83]

Natur-Latex enthält bis zu 250 unterschiedliche Proteine und Polypeptide. Davon haben rund 20 % (ungefähr 50) antigene Eigenschaften, allerdings wurden davon nur 13 von der WHO (*Allergen Nomenclature Sub-Committee of the International Union of Immunological Societies*; IUIS) als allergen eingestuft. Nach dem Darstellungsprozess von unterschiedlichen Produkten verbleiben noch vier Proteine, die eine allergene Wirkung zeigen. Dies sind die Allergene Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02. Des Weiteren ist das "Latex-Frucht-Syndrom" in der Forschung von aktuellem Interesse, da Kreuzallergien zwischen Natur-Latex und Bananen, Avocado, Kiwi und Kartoffeln

4. Ergebnisse und Diskussion

auftreten können.^[84]

Die Sensibilisierung erfolgt dabei über die Haut, die Schleimhäute und bei Inhalation von Allergenen, die durch das Puder bei gepuderten Produkten übertragen werden, und kann unter anderem zu Ödemen, Nesselfieber, Bindehautentzündungen, Asthma bis hin zum anaphylaktischen Schock führen.^[81, 85, 86] Die Berufskrankheit, die unter dem Begriff „durch allergisierende Stoffe verursachte obstruktive Atemwegserkrankungen“ (BK 4301) zusammengefasst wird, zeigt, dass neben Mehl bzw. Konditorware (61,1 %), Haarbehandlungsmitteln (5 %) und Desinfektionsmitteln (3,2 %), Naturkautschuk als ebenfalls ein Auslöser für diese Krankheit sein kann (2,5 %).^[87]

Bei Hev b 1, auch *Rubber Elongation Factor* (REF) genannt, handelt es sich um ein Allergen mit einem Molekulargewicht von 14,6 kDa und einem Isoelektrischen Punkt (IEP) von 4,9. Dieses wurde als erstes Latexallergen identifiziert.^[88] Hev b 1 ist hydrophob, an große Latexpartikel (Durchmesser >350 nm) gebunden und besteht aus 137 Aminosäuren.^[89] Die Aminosäuresequenz zeigt, außer zu Hev b 3, keine Homologien mit anderen bekannten Sequenzen. 50 % der im Gesundheitswesen tätigen Menschen (engl. *health care workers*, HCW), sind gegenüber Hev b 1 allergisch.^[90]

Hev b 3 wurde zuerst 1993 von ALENIUS identifiziert und besitzt ein Molekulargewicht von 23 kDa und einen IEP von 4,8.^[91] Es ist ebenfalls an Latexpartikel gebunden und besitzt Ähnlichkeiten zu Hev b 1. Vergleiche der Sequenzen zeigen, dass sechs der 14 sequenzierten Peptidstränge denen von Hev b 1 entsprechen. Diese beiden Allergene besitzen einen Zusammenhang mit der Neuralrohrfehlbildung *spina bifida* (auch bekannt als „offener Rücken“). Menschen, bei denen diese angeborene Fehlbildung auftritt, zeigen häufig Latex-Allergien, insbesondere auf diese beiden Allergene. Der genaue Zusammenhang zwischen der Fehlbildung und der Latex-Allergie ist bis heute noch nicht geklärt.

Hev b 5 ist ein saures Protein mit einem Molekulargewicht von 16 kDa und einem IEP von 3,5. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt große Ähnlichkeiten mit einem sauren Protein, welches in Kiwis gefunden wurde. Da die Sequenzen zu 47 % übereinstimmen, wäre dies eine mögliche Erklärung dafür, dass viele Patienten, die gegen Latex allergisch sind, auch Kreuzallergien gegenüber Kiwis zeigen.

Hev b 6.02, welches auch Hevein genannt wird, wurde zuerst von CHEN *et al.* und ALENIUS *et al.* isoliert.^[92, 93] Hev b 6.02 ist ein Protein, welches dem größeren Prohevein (Hev b 6.01) zugeordnet wird. Prohevein ist ein 20 kDa großes Protein,

4. Ergebnisse und Diskussion

welches in zwei Einheiten unterteilt werden kann: Zum einen in die 4,7 kDa große N-terminale Einheit, welche aus 43 Aminosäuren besteht und einen IEP von 4,9 besitzt (Hevein, Hev b 6.02). Zum anderen in die 14 kDa große C-terminale Einheit, welche aus 144 Aminosäuren besteht (Hev b 6.03). Hev b 6.02 ist ein kleines Protein, welches vor allem aus Cystein und Glycin besteht und dessen Struktur der von Lektinen (d. h. Proteine, welche spezifisch Kohlenhydratstrukturen binden können) ähnelt.^[89, 94–98] Untersuchungen haben ergeben, dass 80 % der Menschen, die im Gesundheitswesen tätig sind, sensibilisiert gegenüber Hev b 6.02 sind.^[96] Damit ist Hev b 6.02 das Protein, welches die größte allergene Wirkung besitzt. In Abbildung 23 ist das Monomer von Hev b 6.02 abgebildet. Die Farbänderung bezieht sich auf die Änderung der Aminosäuren des Proteins von N-Terminus zu C-Terminus.^[99]

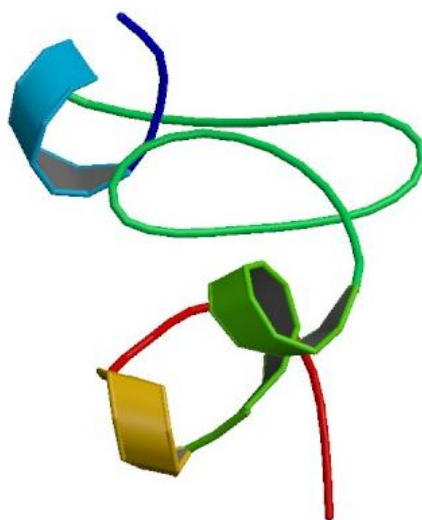


Abbildung 23: Monomereinheit von Hev b 6.02.^[99]

Die Reduktion der Latexallergene ist in der Forschung von großem Interesse. So wird unter anderem beschrieben, dass es möglich ist, die Proteine aus Natur-Latex zu entfernen, indem man den Latex mit Harnstoff in Anwesenheit eines anionischen Tensids inkubiert und dann aufreinigt. Diese Methode führt zu einer deutlich geringeren Allergenkonzentration im Latex.^[100] Des Weiteren gibt es die Möglichkeit, Latex vor der Behandlung mit Harnstoff mit einem proteolytischen Enzym zu behandeln mit anschließender, weiterer Entfernung der Allergene mit Harnstoff und SDS.^[101]

Eine Erweiterung dieser Methode beinhaltet lediglich eine geringe Veränderung. Dabei wird der Latex ebenso mit Harnstoff und SDS versetzt, allerdings wird zusätzlich noch ein polares organisches Lösungsmittel zugesetzt. Nach der Aufreinigung erhält man mit

4. Ergebnisse und Diskussion

dieser Methode einen Allergen-Gehalt unter der Nachweisgrenze, sofern angenommen wird, dass der gesamte Allergengehalt nur mittels physikalischer Wechselwirkungen (Physisorption) im Natur-Latex an die Oberfläche der Latex-Partikel adsorbiert ist und keine chemischen Bindungen (Chemisorption) vorliegen, was zu weiterem Allergengehalt im NRL führen könnte, der nicht durch Desorption freigesetzt werden kann.^[102]

Ferner findet man in der Literatur die Bindung von Latex-Allergenen an das Puder von gepuderten Handschuhen bzw. die Beförderung der Latex-Allergene durch das Puder. Unter der Annahme, dass das Puder von gepuderten Latex-Handschuhen die Latex-Proteine in die Umwelt befördert, wurden verschiedene Puder (auch Calciumcarbonat) untersucht. Dabei kann zwischen Proteinen, die an das Puder gebunden sind, und Proteinen, welche nur vom Puder befördert werden, also wieder desorbiert werden können, unterschieden werden. Die Ergebnisse zeigen, dass sich Proteine sowohl desorbieren lassen, als auch, dass ein gewisser Teil irreversibel an das Puder gebunden ist.^[80]

Eine weitere Möglichkeit, die allergenen Proteine zu entfernen, ist das Versetzen von Natur-Latex, der durch Gamma-Strahlung oder einen Elektronenstrahl vulkanisiert wird (engl. *radiation-vulcanized natural rubber latex*, RVNRL), mit wasserlöslichen Polymeren, z. B. Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Auswaschen mit Ammoniak. Nach der Aufreinigung erhält man RVNRL, der keine wasserlöslichen Proteine mehr enthält.^[103]

Die Beladung von Latex mit Calciumcarbonat zur Fertigung von Latex-Handschuhen wird in der Literatur mehrfach beschrieben. Dabei werden vor allem die Veränderungen der mechanischen Eigenschaften wie Dehnbarkeit, Reißfestigkeit und Härtegrad erfasst und die Modifizierung von Calciumcarbonat zur Steigerung der Oxidationsbeständigkeit untersucht.^[104, 105] So ist bekannt, dass Calciumcarbonat bis zu 35 phr (engl. *parts per hundred rubber*) in den unvulkanisierten Latex und in proteinfreien NRL (engl. *deproteinized natural rubber latex*, DNRL) eingebracht werden kann, bevor die mechanischen Eigenschaften erheblich nachlassen. Die Unterschiede zwischen NRL und DNRL sind dabei lediglich in der Dehnbarkeit des Werkstückes erheblich. So ist die Dehnbarkeit der DPNR-Handschuhe deutlich geringer als die der NRL-Handschuhe. Die optimalen mechanischen Eigenschaften liegen allerdings für beide Materialien bei 25 phr Calciumcarbonat.^[106, 107]

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1.2.1 Die verwendeten Calciumcarbonate

Neben den selbst hergestellten polymorphen Calciumcarbonaten Calcit, Aragonit und Vaterit, welche bereits in Absatz 4.1.1.1 beschrieben wurden, wurden sechs weitere Calciumcarbonatproben von der Firma SCHAEFER KALK zur Verfügung gestellt, die im Folgenden charakterisiert werden.

4.1.2.1.1 Charakterisierung der Calciumcarbonate der Firma SCHAEFER KALK

Die von der Firma SCHAEFER KALK bereitgestellten Calciumcarbonatproben wurden unter Angabe einiger produktspezifischer Eigenschaften zur Verfügung gestellt. Diese Daten sind in Tabelle 6 zu sehen. Sie umfassen die im Nachfolgenden verwendete Abkürzung der Proben, die Angabe der nominellen Phase und Morphologie und die mittels BET gemessene spezifische Oberfläche der Proben.

Tabelle 6: Angaben zu den von der Firma SCHAEFER KALK bereitgestellten Proben sowie die im Folgenden verwendeten Abkürzungen.

Abkürzung	Phase	Spezifische Oberfläche (BET) $/\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$
SK-1	Rhomboeder, Calcit	4,5
SK-2	Rhomboeder, Calcit	22,5
SK-3	Rhomboeder, Calcit	40
SK-4	Nadeln, Aragonit	10,4
SK-5	Skalenoeder, Calcit	8,8
SK-6	Plättchen, Calcit	16,5

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Proben, welche von der Firma SCHAEFER KALK zur Verfügung gestellt wurden, wurden im weiteren Verlauf mittels Rasterelektronenmikroskopie, Röntgenbeugung, Thermogravimetrie und Elementaranalyse charakterisiert. In Abbildung 24 sind die REM-Aufnahmen der sechs Proben dargestellt. Es ist zu erkennen, dass es sich bei der Probe SK-1 um stark agglomerierte Partikel handelt, deren Morphologie sich nicht exakt bestimmen lässt. Somit sind auch keine rhomboedrischen Strukturen zu erkennen, wie von der Firma SCHAEFER KALK (Tabelle 6) angegeben. Bei SK-2 ist erkennbar, dass es sich nicht, wie angegeben, um Rhomboeder handelt, sondern um kugelförmige Partikel, welche ungefähr 100 nm groß sind. SK-3 besteht aus kleinen Partikeln, die ebenfalls ungefähr 100 nm groß sind. Die genaue Morphologie lässt sich auch hier nicht erkennen und reicht von kugelförmigen Partikeln bis hin zu mehrflächigen Polyedern. Die definierten Strukturen eines Rhomboeders lassen sich auch bei dieser Probe nicht identifizieren. Die Probe SK-4 besteht aus für Aragonit charakteristischen Nadeln mit einer Länge von ungefähr 1 μm und einem Durchmesser von ca. 100 nm. Bei der Probe SK-5 lassen sich sklenoedrische Strukturen teilweise erkennen, allerdings liegt auch hier keine homogene Probe vor. Bei SK-6 lassen sich Plättchen erkennen, welche eine durchschnittliche Größe von 700 nm besitzen.

4. Ergebnisse und Diskussion

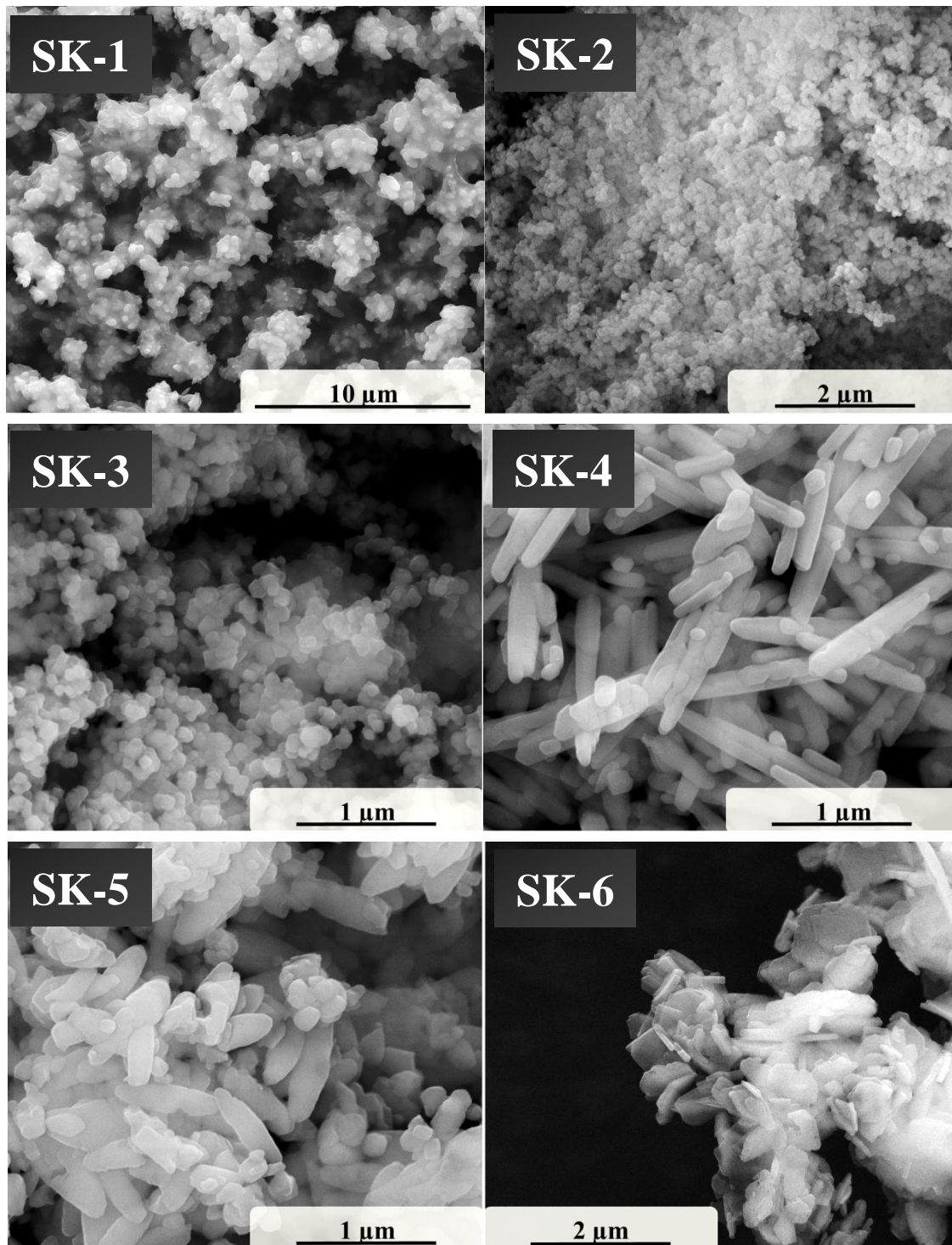


Abbildung 24: REM-Aufnahmen der von SCHAEFER KALK bereitgestellten Proben.

Die Proben der Firma SCHAEFER KALK wurden mittels Röntgendiffraktometrie auf ihre Phasenreinheit hin untersucht. Die Diffraktogramme und die Literaturreflexe sind in Abbildung 25 zu sehen. Die Literaturreflexe lassen sich den Referenzen 01-083-0577 (Calcit), 01-076-0606 (Aragonit) und 01-072-0506 (Vaterit) zuordnen.

4. Ergebnisse und Diskussion

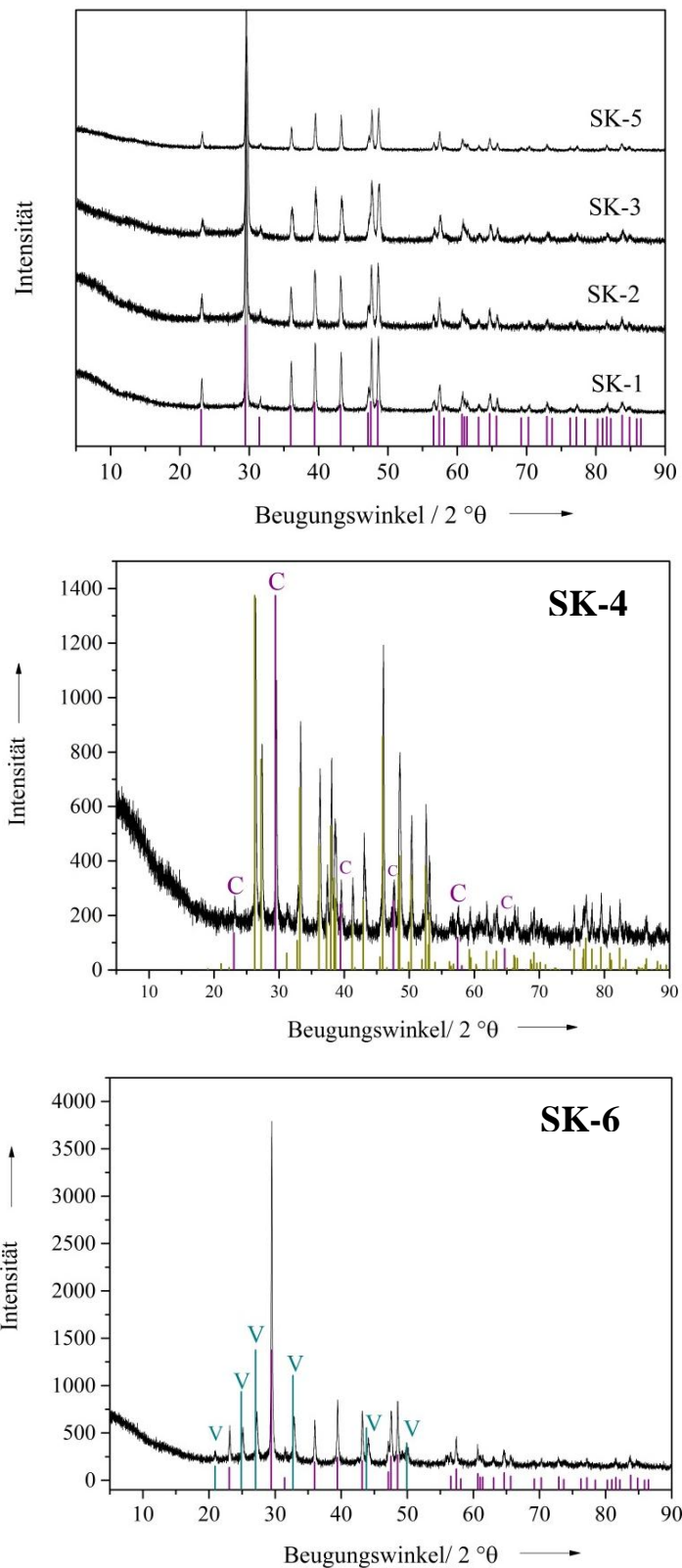


Abbildung 25: Pulverdiffraktogramme der von SCHAEFER KALK bereitgestellten Proben. Die lilafarbenen Banden zeigen die Literaturreflexe von Calcit, die grünen die von Aragonit und die hellblauen die von Vaterit. In den Proben SK-4 und SK-6 sind die Reflexe der weiteren Phase mit "C" (Calcit) bzw. "V" (Vaterit) hervorgehoben.

4. Ergebnisse und Diskussion

Bei den Proben SK-1, SK-2, SK-3 und SK-5 handelt es sich um phasenreinen Calcit. Die Probe SK-4 besteht aus Aragonit, welcher Anteile an Calcit enthält. Die Probe SK-6 besteht aus Calcit, welcher Anteile an Vaterit enthält. Somit liegen diese beiden Proben nicht, wie in Tabelle 6 angegeben, phasenrein vor.

Die Proben der Firma SCHAEFER KALK wurden ebenfalls mittels Elementaranalyse und Atomabsorptionsspektroskopie charakterisiert. Die zusammengefassten Ergebnisse sind in Tabelle 7 zu sehen. Der Gehalt an Calcium, Kohlenstoff und Sauerstoff entspricht ungefähr den theoretischen Werten von Calciumcarbonat. Zudem konnte bei allen Proben Wasserstoff nachgewiesen werden. Bei den Proben SK-2 bis SK-4 liegt dieser Gehalt unter

0,1 Gew.-%. Die Probe SK-1 enthält $0,154 \pm 0,004$ Gew.-% Wasserstoff, die Probe SK-5 $0,145 \pm 0,009$ Gew.-% und die Probe SK-6 $0,28 \pm 0,01$ Gew.-%. Dies kann wie bei den selbst synthetisierten Proben mit Rückständen an Wasser aufgrund von Restfeuchtigkeit des Feststoffes erklärt werden. Der deutlich erhöhte Wert der Probe SK-6 gegenüber den anderen Proben lässt ebenfalls den Rückschluss zu, dass die Probe neben Calcit auch Vaterit enthält und somit der Wassergehalt aufgrund dessen erhöht ist. Berechnet man aus den elementaranalytischen Daten für Wasserstoff den Gehalt an Wasser in den Proben SK-1, SK-5 und SK-6, so erhält man Werte von $1,32 \pm 0,03$ Gew.-% (SK-1), $1,16 \pm 0,07$ Gew.-% (SK-5) und $2,24 \pm 0,08$ Gew.-% (SK-6).

Tabelle 7: Elementaranalytische Daten der von SCHAEFER KALK bereitgestellten Proben sowie die theoretischen Werte für Calciumcarbonat (CaCO_3).

CaCO_3	Ca gefunden / %	C gefunden / %	O berechnet / %	H gefunden / %
SK-1	$39,75 \pm 0,35$	$11,7 \pm 0,0$	$48,39 \pm 0,36$	$0,154 \pm 0,004$
SK-2	$39,85 \pm 0,07$	$11,8 \pm 0,0$	$48,25 \pm 0,07$	$< 0,1$
SK-3	$39,50 \pm 0,42$	$11,8 \pm 0,0$	$48,60 \pm 0,42$	$< 0,1$
SK-4	$40,10 \pm 0,57$	$11,8 \pm 0,0$	$48,00 \pm 0,56$	$< 0,1$
SK-5	$40,35 \pm 0,35$	$11,6 \pm 0,0$	$47,91 \pm 0,36$	$0,145 \pm 0,009$
SK-6	$37,70 \pm 0,42$	$11,5 \pm 0,0$	$50,52 \pm 0,41$	$0,28 \pm 0,01$
Theoretisch	40,04	12,00	47,95	0,00

4. Ergebnisse und Diskussion

In den Thermogrammen, welche in Abbildung 26 zu sehen sind, ist zu erkennen, dass sich der Massenverlust über zwei definierte Stufen vollzieht. Die erste Stufe bis ca. 450 °C ist dem Verlust von Kristallwasser zuzuschreiben. Die zweite Stufe ist die Zersetzung des Calciumcarbonats zu Kohlenstoffdioxid und Calciumoxid.

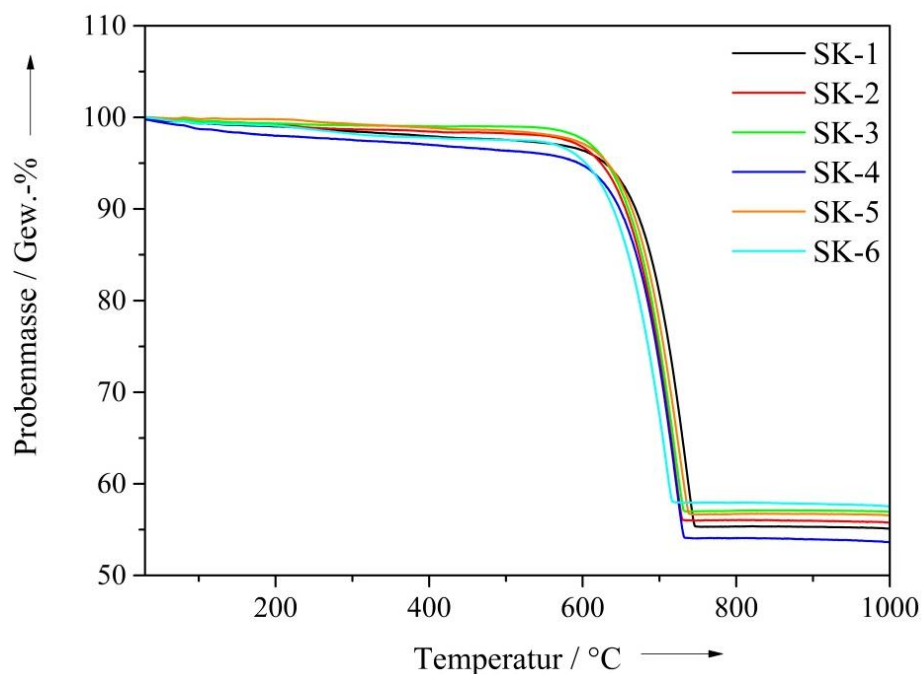


Abbildung 26: Thermogramme der sechs SCHAEFER KALK-Proben. Die Messung erfolgte von 30 °C bis 1200 °C unter Sauerstoffatmosphäre bei einer Heizrate von 2 K min⁻¹.

In Abbildung 26 ist zu erkennen, dass in allen Proben der Firma SCHAEFER KALK ein Anteil an Wasser nachzuweisen ist. Die genauen Werte der jeweiligen Masseverluste sind in Tabelle 8 gezeigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 8: Mittels Thermogravimetrie bestimmte Massenverluste der Proben der Firma SCHAEFER KALK.

CaCO_3	Kristallwasser / Gew.-%	Kohlendioxidverlust / Gew.-%
SK-1	2,6	42,3
SK-2	1,6	42,4
SK-3	0,7	41,9
SK-4	3,6	42,6
SK-5	1,5	41,8
SK-6	2,4	39,9

Der Verlust von Kristallwasser erstreckt sich von 0,7 Gew.-% (SK-3) bis 3,6 Gew.-% (SK-4) und ist somit deutlich höher als der mittels Elementaranalyse bestimmte Wert. Der Massenverlust an Kohlenstoffdioxid liegt zwischen 39,9 Gew.-% (SK-6) und 42,6 Gew.-% (SK-4). Der theoretische Massenverlust von Kohlenstoffdioxid beträgt 44,01 Gew.-%. Somit liegen die gemessenen Werte etwas unter dem erwarteten Wert.

Aus den elementaranalytischen und thermogravimetrischen Daten lassen sich die Zusammensetzungen der Proben bestimmen. Diese sind für die SCHAEFER KALK-Proben in Tabelle 9 zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 9: Aus den elementaranalytischen und thermogravimetrischen Daten berechnete Zusammensetzung der sechs verwendeten SCHAEFER KALK-Proben.

CaCO ₃	Berechnete Zusammensetzung
SK-1	Ca ₁ (CO ₃) _{0,97} · 0,144 H ₂ O
SK-2	Ca ₁ (CO ₃) _{1,02} · 0,09 H ₂ O
SK-3	Ca ₁ (CO ₃) _{0,97} · 0,037 H ₂ O
SK-4	Ca ₁ (CO ₃) _{0,97} · 0,198 H ₂ O
SK-5	Ca ₁ (CO ₃) _{0,94} · 0,084 H ₂ O
SK-6	Ca ₁ (CO ₃) _{0,96} · 0,136 H ₂ O

Die so bestimmten Summenformeln zeigen Calcium zu Carbonat-Verhältnisse von nahezu eins zu eins, welche auch der Theorie entsprechen. Der Wassergehalt ist variabel und für alle SCHAEFER KALK-Proben unterschiedlich.

4.1.3 Experimentelle Durchführung

4.1.3.1 Extraktion der Allergene aus Naturkautschukprodukten

Die Freisetzung der Allergene aus Naturlatexhandschuhen erfolgte mit der vom *Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung* (IPA, Ruhr-Universität Bochum) vorgeschlagenen Methode.^[108] Dazu wurde der Latexhandschuh der Firma Profissimo (bezogen über den DM-Drogeriemarkt) in ungefähr 1 cm² große Stücke geschnitten und mit einem Volumen zu Masse Verhältnis [mL g⁻¹] von 6,66 zu 1 mit bidestilliertem Wasser oder PBS (engl. *phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung) versetzt. Die Extraktion der Allergene erfolgte für 5 h bei 37 °C und 250 U min⁻¹ auf einem Kreisschüttler. Zudem wurde das Gemisch alle 15 Min durchmischt. Nachdem die Werkstücke entfernt wurden, wurde die Lösung bei 1400 g für 15 Min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die in bidestilliertem Wasser oder PBS befindlichen Allergene wurden für die weiteren Arbeiten bei -20 °C gelagert.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1.3.2 Durchführung der Adsorptionsversuche

Zur Durchführung der Adsorptionsversuche wurden ungefähr 50 mg der jeweiligen Calciumcarbonatphase eingewogen und mit 1 mL der allergenhaltigen Lösung versetzt. Um den Einfluss der verwendeten Allergen-Konzentration auf die Adsorption zu ermitteln, wurden desweiteren Verdünnungsreihen der verwendeten Allergene hergestellt.

Alle Adsorptionsversuche erfolgten bei Raumtemperatur (RT) oder 37 °C. Die Proben wurden für 24 h bei 100 U min⁻¹ auf einem Kreisschüttler geschüttelt. Anschließend wurde das Adsorbens bei 755 g für 15 Min abzentrifugiert und der Überstand für den ELISA-Assay verwendet. In Abbildung 27 ist eine schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise abgebildet.

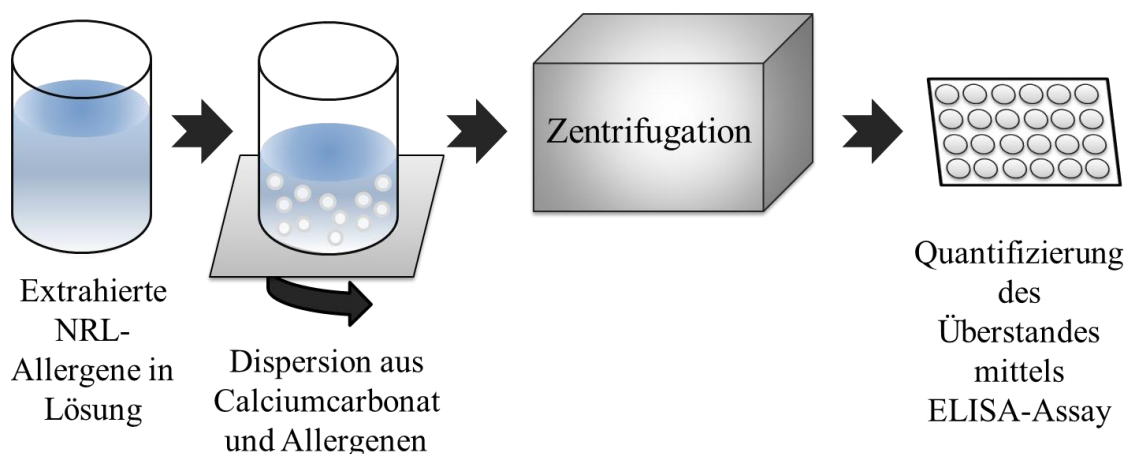


Abbildung 27: Schematische Darstellung der experimentellen Durchführung der Adsorptionsversuche.

4.1.4 Ergebnisse der Adsorptionsversuche

4.1.4.1 Adsorption von Hev b 1

Die Adsorption der Hev b 1-Reinsubstanz erfolgte wie unter Absatz 4.1.3.2 beschrieben. Der Allergehalt wurde mittels ELISA-Assay bestimmt. Um die unbekannten Konzentrationen der Proben zu bestimmen, musste zunächst eine Kalibriergerade aufgenommen werden. Dazu wurden definierte Konzentrationen des reinen Allergens mittels ELISA vermessen. Durch eine doppelt-logarithmische Auftragung konnte eine Ausgleichsgerade durch die gemessenen Werte gelegt werden. Um die adsorbierte

4. Ergebnisse und Diskussion

Konzentration zu erhalten, konnten die gemessenen Absorptionen mit Hilfe der Geradengleichung berechnet werden. Da es zu Wechselwirkungen zwischen dem FITkit® und dem extrahierten Allergen Hev b 1 kam, konnte die Adsorption des freigesetzten Allergens leider nicht in Anwesenheit der anderen Allergene untersucht werden. Bei Anfertigung von Verdünnungsreihen des extrahierten Allergens war zu beobachten, dass bei geringeren Konzentrationen höhere Konzentrationen als die Ausgangskonzentration nachgewiesen werden konnten. Aufgrund dieser Tatsache, die ausschließlich bei Hev b 1 beobachtet werden konnte und vom Hersteller bestätigt wurde, wurden die Adsorptionsuntersuchungen mit der Reinsubstanz durchgeführt. Deswegen sind im Nachfolgenden lediglich die Ergebnisse für den Einfluss des Lösungsmittels und der Temperatur gezeigt. Die Kalibriergerade für bekannte Konzentrationen an Hev b 1 ist in Abbildung 28 dargestellt.

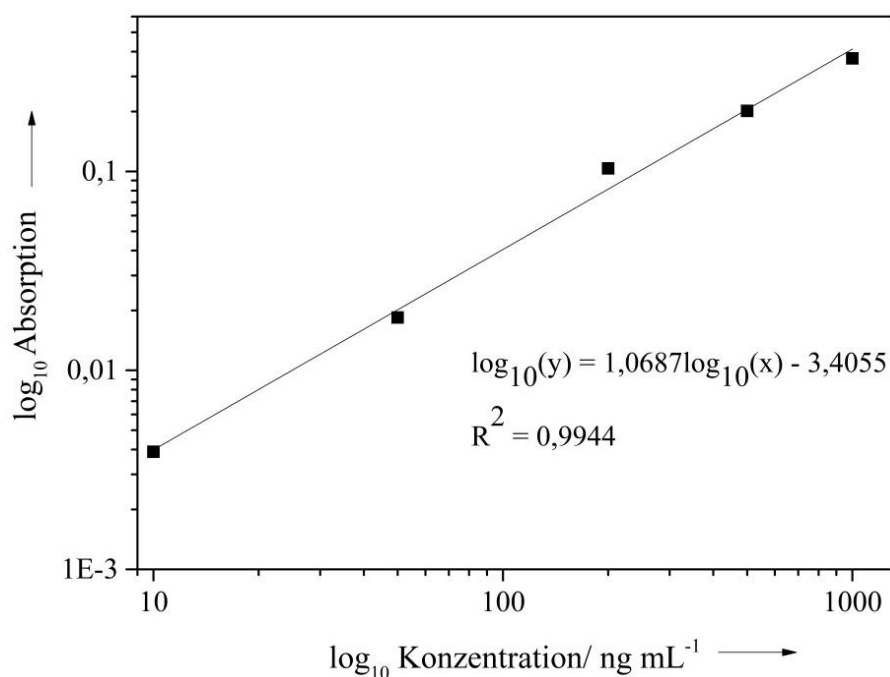


Abbildung 28: Kalibriergerade bekannter Konzentrationen des Allergens Hev b 1 mit angegebener Funktion zur Berechnung der unbekannten Konzentrationen und dem Korrelationskoeffizienten.

In den Tabellen 10 und 11 sind die Ergebnisse der Adsorptionsversuche von Hev b 1 für die Variation des Mediums und den Einfluss der Temperatur während der Adsorption dargestellt. Zur Bestimmung der adsorbierten Masse an Allergen, bezogen auf die spezifische Oberfläche, wurden für die eigenen Proben näherungsweise die Werte aus Literatur [42] verwendet. Die Synthese der Calciumcarbonate erfolgte in der Literatur auf

4. Ergebnisse und Diskussion

anderem Wege, allerdings sind die dort erhaltenen polymorphen Phasen mit den eigenen nahezu identisch. Die spezifische Oberfläche für Calcit beträgt $0,7 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, für Aragonit $2,1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ und für Vaterit $4,9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

Neben der adsorbierten Masse an Allergen $m(\text{ads})(\text{BET})$, bezogen auf die spezifische Oberfläche, wurden noch die adsorbierte Konzentration $c(\text{ads})$, die adsorbierte Masse $m(\text{ads})$, die prozentuale Adsorption (Ads.) und die Anzahl der Allergene pro Quadratmeter Oberfläche $N(\text{ads.})$ berechnet. Dabei wurden die nachstehenden Gleichungen verwendet.

Die adsorbierte Konzentration $c(\text{ads})$ konnte mit Hilfe der Geradengleichung und der mittels ELISA bestimmten Absorption des Überstandes und der Ausgangskonzentration c_0 an Allergen bestimmt werden. Über die Einwaage m_{Einwaage} an Calciumcarbonat und dem Volumen (für alle Versuche $V=1 \text{ mL}$) ließ sich die adsorbierte Masse an Allergen pro Milligramm Calciumcarbonat berechnen:

$$m(\text{ads}) = \frac{c(\text{ads})}{m_{\text{Einwaage}}} \cdot V \quad \text{Gleichung 7}$$

Die prozentuale Adsorption berechnet sich mit Hilfe von Gleichung 8:

$$\text{Ads} = \frac{c(\text{ads})}{c_0} \cdot 100 \% \quad \text{Gleichung 8}$$

Die adsorbierte Masse an Allergen bezogen auf die spezifische Oberfläche S der verschiedenen Calciumcarbonate berechnete sich analog zu Gleichung 9:

$$m(\text{ads})(\text{BET}) = \frac{m(\text{ads})}{S(\text{BET}) \cdot 10^{-3}} \quad \text{Gleichung 9}$$

Die zur Bestimmung der Anzahl an Allergen auf der Oberfläche der Calciumcarbonate benötigte Masse der Allergene ließ sich über das Molekulargewicht des jeweiligen Allergens und der Avogadrokonstanten N_A berechnen, so dass für die Anzahl der Moleküle nach Gleichung 10 folgt:

$$N(\text{ads}) = \frac{m(\text{ads})(\text{BET})}{m(\text{Allergen})} \quad \text{Gleichung 10}$$

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 10: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 1 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). (links: $c_0(\text{Hev b 1}) = 203 \text{ ng mL}^{-1}$, Extraktionsmittel PBS; $T = \text{RT}$; rechts: $c_0(\text{Hev b 1}) = 200 \text{ ng mL}^{-1}$, Extraktionsmittel bidestilliertes Wasser; $T = \text{RT}$)

	$c_0 = 203 \text{ ng mL}^{-1}$, PBS					$c_0 = 200 \text{ ng mL}^{-1}$, bidest. Wasser				
Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	94	1,84	47	409	$1,69 \cdot 10^{13}$	163	3,07	81	681	$2,82 \cdot 10^{13}$
SK-2	88	1,65	44	73	$3,03 \cdot 10^{12}$	179	3,38	90	150	$6,21 \cdot 10^{12}$
SK-3	81	1,53	40	38	$1,58 \cdot 10^{12}$	191	3,60	95	90	$3,72 \cdot 10^{12}$
SK-4	84	1,74	41	168	$6,93 \cdot 10^{12}$	189	3,63	94	349	$1,44 \cdot 10^{13}$
SK-5	47	1,01	23	114	$4,73 \cdot 10^{12}$	198	3,47	99	394	$1,63 \cdot 10^{13}$
SK-6	85	1,61	42	98	$4,04 \cdot 10^{12}$	188	3,75	94	227	$9,39 \cdot 10^{12}$
C	86	1,81	42	2581	$1,07 \cdot 10^{14}$	192	3,63	96	5185	$2,14 \cdot 10^{14}$
A	77	1,44	38	687	$2,84 \cdot 10^{13}$	153	2,88	76	1372	$5,67 \cdot 10^{13}$
V	66	1,27	32	258	$1,07 \cdot 10^{13}$	170	3,21	85	655	$2,71 \cdot 10^{13}$

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 11: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 1 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). Extraktionsmittel: Bidestilliertes Wasser; $T=37\text{ }^\circ\text{C}$, $c_o(\text{Hev b 1})=219\text{ ng mL}^{-1}$.

Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	142	2,76	65	613	$2,54 \cdot 10^{13}$
SK-2	138	2,58	63	114	$4,73 \cdot 10^{12}$
SK-3	142	2,70	65	67	$2,79 \cdot 10^{12}$
SK-4	152	3,15	69	302	$1,25 \cdot 10^{13}$
SK-5	159	3,38	73	384	$1,59 \cdot 10^{13}$
SK-6	157	2,97	72	179	$7,43 \cdot 10^{12}$
C	154	3,25	70	4636	$1,92 \cdot 10^{14}$
A	147	2,74	67	1306	$5,40 \cdot 10^{13}$
V	159	3,08	73	627	$2,59 \cdot 10^{13}$

Um einen besseren Überblick über diese Ergebnisse geben zu können, sind in der nachfolgenden Abbildung 29 die Ergebnisse grafisch dargestellt. Dabei wurde der Einfluss der Temperatur und des Mediums abgebildet. Der Einfluss der Konzentration konnte, wie bereits erwähnt, bei dem Allergen Hev b 1 nicht gezeigt werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

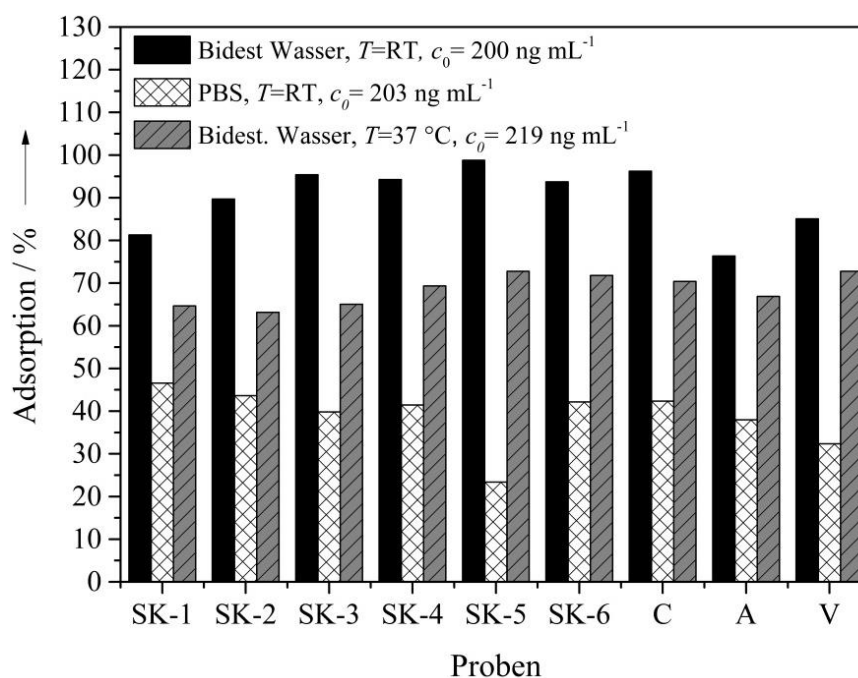


Abbildung 29: Darstellung des Einflusses der Temperatur und des Lösungsmittels bei der Adsorption auf die prozentuale Adsorption von Hev b 1. Schwarz ist die Adsorption an Hev b 1 bei einer Ausgangskonzentration von $c_0=200 \text{ ng mL}^{-1}$ mit bidestilliertem Wasser dargestellt, weiß die prozentuale Adsorption bei Verwendung von PBS mit einer Ausgangskonzentration von $c_0=203 \text{ ng mL}^{-1}$ und grau die prozentuale Adsorption bei $T=37^\circ\text{C}$ und bidestilliertem Wasser mit einer Ausgangskonzentration von $c_0=219 \text{ ng mL}^{-1}$.

An allen Phasen adsorbiert das Allergen für die jeweiligen Versuchsparameter nahezu gleichwertig. Die Adsorption von Hev b 1 mit bidestilliertem Wasser und bei $T=RT$ zeigt die höchsten prozentualen Adsorptionen von ca. 80 bis 95 %. Dies entspricht adsorbierten Massen pro Milligramm Calciumcarbonat von $2,88 \text{ ng mg}^{-1}$ (A) bis $3,75 \text{ ng mg}^{-1}$ (SK-6). Die Adsorption mit PBS als Lösungsmittel ist deutlich vermindert und zeigt lediglich prozentuale Adsorptionen von ca. 45 %. Dies entspricht einer maximal adsorbierten Masse an Allergen pro mg Calciumcarbonat von $1,84 \text{ ng mg}^{-1}$ (SK-1). Der Einfluss des Lösungsmittels ist auch bei anderen Allergenen gegeben (Hev b 6.02). Durch Variation der Temperatur zu $T=37^\circ\text{C}$ konnte mit bidestilliertem Wasser als Lösungsmittel kein Anstieg der Adsorption nachgewiesen werden, sondern eine leichte Absenkung. Die prozentualen Adsorptionen betragen bei erhöhter Temperatur maximal 70 %. Dahingegen zeigen alle anderen Allergene bei Variation der Temperatur keine nennenswerte Steigerung oder Absenkung der prozentualen Adsorption. Dieser Effekt konnte nur bei der Hev b 1-Reinsubstanz nachgewiesen werden und kann möglicherweise damit erklärt werden, dass eine Temperaturerhöhung Einfluss auf die Proteinstruktur hat. Eine

4. Ergebnisse und Diskussion

Temperaturerhöhung kann zur Denaturierung der Proteine führen, so dass sich somit die Sekundär- und/oder Tertiärstruktur verändert, die Primärstruktur (Abfolge der Aminosäuren) allerdings beibehalten wird.^[109] Dieser Vorgang sollte bei der gewählten Temperatur von $T=37\text{ °C}$ reversibel sein, kann allerdings einen Einfluss auf die Adsorption des Proteins ausüben. Des Weiteren zeigt die Adsorption von Hev b 1, dass die Adsorption von der spezifischen Oberfläche der Partikel sowie von der Polymorphie und Morphologie unabhängig ist.

4.1.4.2 Adsorption von Hev b 3

Um die unbekannten Konzentrationen des Allergens Hev b 3 zu bestimmen, musste zunächst eine Kalibriergerade aufgenommen werden. Dazu wurden definierte Konzentrationen des reinen Allergens mittels ELISA vermessen. Durch eine doppelt-logarithmische Auftragung wurde eine Ausgleichsgerade durch die gemessenen Werte gelegt. Um die adsorbierte Konzentration zu erhalten, wurden die gemessenen Absorptionen mit Hilfe einer Geradengleichung umgerechnet. Die Kalibriergerade des Allergens Hev b 3 ist in Abbildung 30 zu sehen.

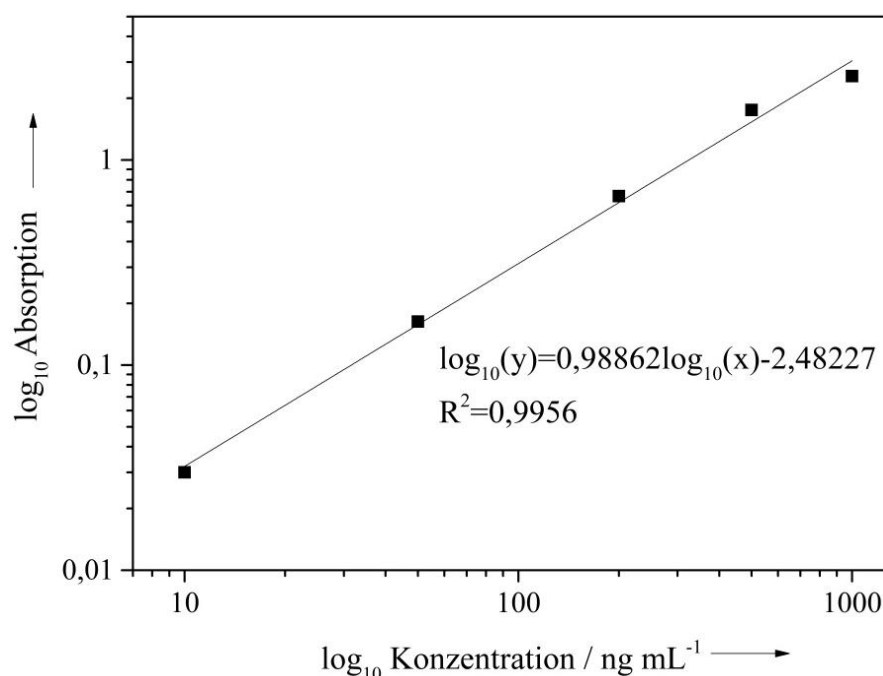


Abbildung 30: Kalibriergerade des Allergens Hev b 3 mit angegebener Funktion zur Berechnung der unbekannten Konzentrationen und dem Korrelationskoeffizienten.

4. Ergebnisse und Diskussion

In den nachfolgenden Tabellen 12 und 13 sind die Ergebnisse der Adsorptionsversuche für das Allergen Hev b 3 für $T=37\text{ °C}$ und $T=RT$ bei unterschiedlichen Konzentrationen gezeigt. Die geringste Ausgangskonzentration von $c_o=6\text{ ng mL}^{-1}$ wird dabei nicht gezeigt, da bei dieser Ausgangskonzentration keine nachweisbare Adsorption des Allergens Hev b 3 stattfand.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 12: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 3 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). Links: Extraktionsmittel bidestilliertes Wasser; $T=37^\circ\text{C}$, $c_o(\text{Hev b 3})=31\text{ ng mL}^{-1}$. Rechts: Extraktionsmittel bidestilliertes Wasser; $T=\text{RT}$, $c_o(\text{Hev b 3})=64\text{ ng mL}^{-1}$.

	$c_0=31\text{ ng mL}^{-1}$					$c_0=64\text{ ng mL}^{-1}$				
Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	27	0,53	87	117	$3,06 \cdot 10^{12}$	57	1,19	89	264	$6,90 \cdot 10^{12}$
SK-2	23	0,48	72	21	$5,57 \cdot 10^{11}$	40	0,78	63	35	$9,07 \cdot 10^{11}$
SK-3	24	0,48	76	11	$2,92 \cdot 10^{11}$	48	0,92	75	23	$6,02 \cdot 10^{11}$
SK-4	28	0,52	89	50	$1,32 \cdot 10^{12}$	59	1,21	93	116	$3,04 \cdot 10^{12}$
SK-5	27	0,52	86	59	$1,54 \cdot 10^{12}$	40	0,76	63	87	$2,27 \cdot 10^{12}$
SK-6	29	0,56	92	34	$8,91 \cdot 10^{11}$	53	1,04	83	63	$1,65 \cdot 10^{12}$
C	21	0,38	66	537	$1,41 \cdot 10^{13}$	56	1,13	88	1614	$4,23 \cdot 10^{13}$
A	22	0,47	72	223	$5,83 \cdot 10^{12}$	47	0,97	74	463	$1,21 \cdot 10^{13}$
V	28	0,58	91	119	$3,11 \cdot 10^{12}$	39	0,75	62	153	$3,99 \cdot 10^{12}$

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 13: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 3 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). Extraktionsmittel: bidestilliertes Wasser; $T=\text{RT}$ (links: $c_0(\text{Hev b 3})=36 \text{ ng mL}^{-1}$; rechts: $c_0(\text{Hev b 3})=18 \text{ ng mL}^{-1}$).

	$c_0=36 \text{ ng mL}^{-1}$					$c_0=18 \text{ ng mL}^{-1}$				
Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	25	0,45	70	109	$2,84 \cdot 10^{12}$	5	0,11	29	23	$6,14 \cdot 10^{11}$
SK-2	21	0,44	60	20	$5,17 \cdot 10^{11}$	7	0,13	38	6	$1,53 \cdot 10^{11}$
SK-3	20	0,39	55	10	$2,52 \cdot 10^{11}$	0	0	0	0	0
SK-4	29	0,59	83	56	$1,48 \cdot 10^{12}$	10	0,19	54	19	$4,85 \cdot 10^{11}$
SK-5	14	0,27	39	31	$8,15 \cdot 10^{11}$	1	0,01	4	2	$4,07 \cdot 10^{10}$
SK-6	3	0,05	8	3	$8,37 \cdot 10^{10}$	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	24	0,47	66	223	$5,83 \cdot 10^{12}$	9	0,19	49	88	$2,31 \cdot 10^{12}$
V	15	0,29	41	59	$1,54 \cdot 10^{12}$	8	0,16	46	33	$8,74 \cdot 10^{11}$

4. Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 31 sind diese Ergebnisse grafisch dargestellt. Dabei wurden zur Darstellung des Konzentrationseinflusses bei $T=RT$ hohe und niedrige Ausgangskonzentrationen gewählt. Zur Darstellung des Temperatureinflusses sind zudem Ergebnisse für $T=37\text{ °C}$ gezeigt.

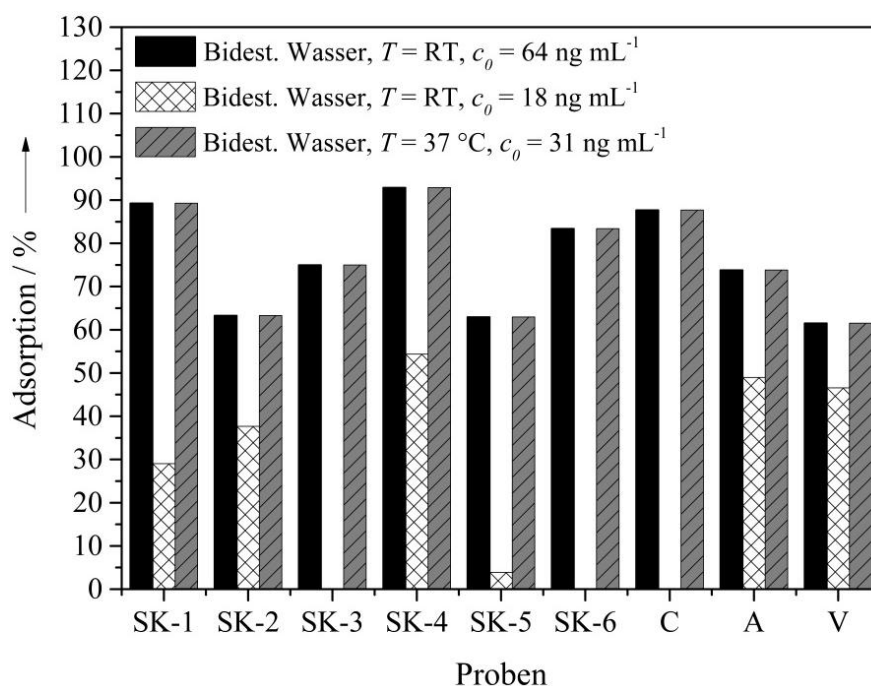


Abbildung 31: Darstellung des Einflusses der Ausgangskonzentration an Allergen und der gewählten Temperatur auf die prozentuale Adsorption. Schwarz ist die Adsorption von Hev b 3 bei einer Ausgangskonzentration von $c_0=64\text{ ng mL}^{-1}$ dargestellt, weiß die prozentuale Adsorption bei einer niedrigeren Ausgangskonzentration von $c_0=18\text{ ng mL}^{-1}$ und grau die prozentuale Adsorption bei $T=37\text{ °C}$ mit einer Ausgangskonzentration von $c_0=31\text{ ng mL}^{-1}$.

Bei der Adsorption von Hev b 3 liegt eine Abhängigkeit der Adsorption des Allergens von der Ausgangskonzentration vor. Bei hohen Konzentrationen adsorbiert das Allergen deutlich besser an alle verwendeten Calciumcarbonate als bei niedriger Konzentration. Dahingegen konnte kein Einfluss der Temperatur beobachtet werden. Ferner ist die Adsorption von Hev b 3, wie auch schon bei Hev b 1 zu beobachten war, unabhängig von der spezifischen Oberfläche der Proben, der Polymorphie und der Morphologie. Die beiden Allergene zeigen große Ähnlichkeiten in ihren Aminosäuresequenzen, was die ähnlichen Ergebnisse in Bezug auf das Adsorptionsverhalten erklärt. Die prozentualen Adsorptionen von Hev b 3 liegen bei der Ausgangskonzentration von $c_0=64\text{ ng mL}^{-1}$ zwischen 60 % und 95 %, wohingegen die prozentuale Adsorption bei $c_0=18\text{ ng mL}^{-1}$ nur

4. Ergebnisse und Diskussion

noch maximal 50 % beträgt. Durch Variation des Lösungsmittels und Durchführung der Experimente mit PBS konnte zudem die Unabhängigkeit der Adsorption vom Lösungsmittel nachgewiesen werden (Daten im Anhang unter 7.1)

Die Adsorption bzw. der Bedeckungsgrad ist bei Gasen an Festkörpern eine Funktion vom Partialdruck und bei Flüssigkeiten an Festkörpern eine Funktion der Konzentration. Zudem ist bekannt, dass Proteine bei geringen Ausgangskonzentrationen deutlich langsamer an Festkörperoberflächen adsorbieren als bei höheren Ausgangskonzentrationen. Dies führt dazu, dass die Proteine die Möglichkeit haben, sich zu entfalten, was im Weiteren dazu führt, dass die Adsorption vermindert wird. Bei hohen Ausgangskonzentrationen verläuft die Adsorption hingegen in zwei Teilschritten. Zunächst die direkte Adsorption des Proteins ohne Konformationsänderung und im Anschluss die langsame Adsorption des entfalteten Proteins.^[110, 111] Obwohl in der Literatur beschrieben wird, dass die Adsorptionseffizienzen bei zunehmender Temperatur deutlich erhöht sind, lässt sich dies für die Adsorption von Hev b 3 nicht bestätigen.^[112]

4.1.4.3 Adsorption von Hev b 5

Die Adsorption von Hev b 5 erfolgte wie unter Absatz 4.1.3.2 beschrieben. Der Allergengehalt wurde mittels ELISA-Assay bestimmt. Um die unbekannten Konzentrationen der Proben zu bestimmen, musste zunächst eine Kalibriergerade aufgenommen werden. Dazu wurden definierte Konzentrationen des reinen Allergens mittels ELISA vermessen. Durch eine doppelt-logarithmische Auftragung wurde eine Ausgleichsgerade durch die gemessenen Werte gelegt (Abbildung 32). Um die adsorbierte Konzentration zu erhalten, wurden die gemessenen Absorptionen mit Hilfe der Geradengleichung berechnet.

4. Ergebnisse und Diskussion

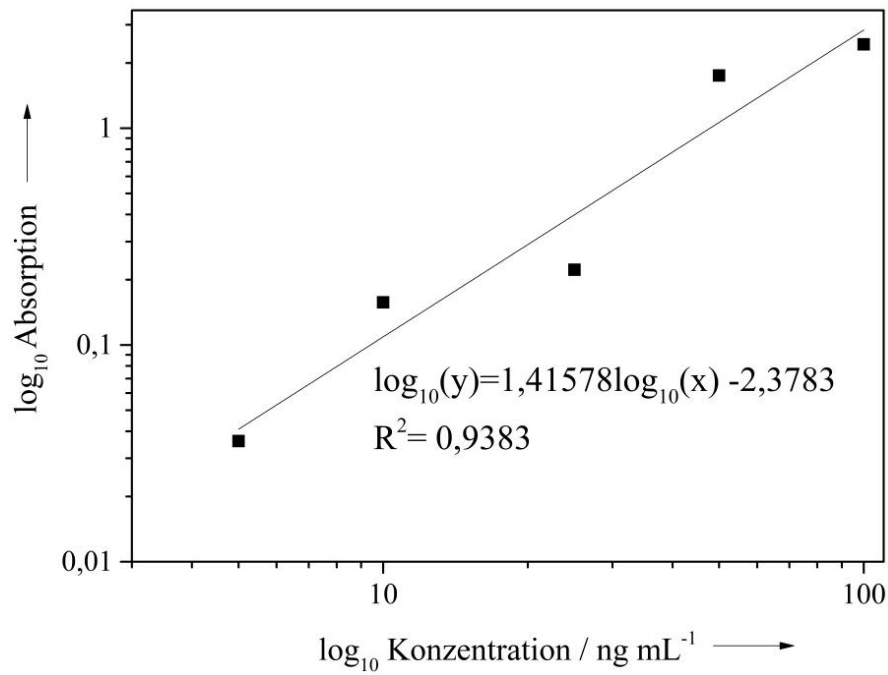


Abbildung 32: Kalibriergerade des Allergens Hev b 5 mit angegebener Funktion zur Berechnung der unbekannten Konzentrationen und dem Korrelationskoeffizienten.

In den nachfolgenden Tabellen 14, 15 und 16 sind die Ergebnisse der Adsorption des Allergens Hev b 5 bei $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $T=\text{RT}$ für unterschiedliche Konzentrationen zusammengefasst dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 14: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 5 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). Extraktionsmittel: bidestilliertes Wasser; $T=37\text{ }^\circ\text{C}$, $c_o(\text{Hev b 5})= 80\text{ ng mL}^{-1}$.

Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	80	1,54	100	343	$1,29 \cdot 10^{13}$
SK-2	80	1,70	100	75	$2,83 \cdot 10^{12}$
SK-3	80	1,51	100	38	$1,42 \cdot 10^{12}$
SK-4	80	1,49	100	144	$5,40 \cdot 10^{12}$
SK-5	80	1,54	100	175	$6,59 \cdot 10^{12}$
SK-6	32	0,62	40	38	$1,42 \cdot 10^{12}$
C	64	1,16	79	1654	$6,22 \cdot 10^{13}$
A	80	1,67	100	796	$2,99 \cdot 10^{13}$
V	80	1,64	100	334	$1,26 \cdot 10^{13}$

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 15: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 5 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). Extraktionsmittel: bidestilliertes Wasser; $T=\text{RT}$ (links: $c_o(\text{Hev b 5})=70 \text{ ng mL}^{-1}$; rechts: $c_o(\text{Hev b 5})=40 \text{ ng mL}^{-1}$).

	$c_0=70 \text{ ng mL}^{-1}$					$c_0=40 \text{ ng mL}^{-1}$				
Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	68	1,43	97	319	$1,20 \cdot 10^{13}$	38	0,72	96	159	$5,98 \cdot 10^{12}$
SK-2	68	1,30	98	58	$2,17 \cdot 10^{12}$	38	0,73	95	32	$1,21 \cdot 10^{12}$
SK-3	68	1,38	98	34	$1,29 \cdot 10^{12}$	38	0,74	97	18	$6,93 \cdot 10^{11}$
SK-4	68	1,36	98	130	$4,90 \cdot 10^{12}$	39	0,74	98	71	$2,66 \cdot 10^{12}$
SK-5	68	1,35	98	154	$5,77 \cdot 10^{12}$	38	0,73	96	83	$3,13 \cdot 10^{12}$
SK-6	20	0,39	28	23	$8,76 \cdot 10^{11}$	26	0,52	65	31	$1,18 \cdot 10^{12}$
C	66	1,37	95	1950	$7,33 \cdot 10^{13}$	36	0,75	92	1077	$4,05 \cdot 10^{13}$
A	67	1,36	96	647	$2,43 \cdot 10^{13}$	36	0,68	90	322	$1,21 \cdot 10^{12}$
V	69	1,33	98	271	$1,02 \cdot 10^{13}$	37	0,76	94	154	$5,79 \cdot 10^{12}$

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 16: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 5 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). Extraktionsmittel: bidestilliertes Wasser; $T=\text{RT}$ (links: $c_0(\text{Hev b 5})= 10 \text{ ng mL}^{-1}$; rechts: $c_0(\text{Hev b 5})= 7 \text{ ng mL}^{-1}$).

	$c_0= 10 \text{ ng mL}^{-1}$					$c_0= 7 \text{ ng mL}^{-1}$				
Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	8	0,16	86	36	$1,36 \cdot 10^{12}$	5	0,11	77	23	$8,76 \cdot 10^{11}$
SK-2	8	0,15	81	7	$2,53 \cdot 10^{11}$	6	0,12	84	5	$1,92 \cdot 10^{11}$
SK-3	8	0,16	82	4	$1,46 \cdot 10^{11}$	5	0,09	71	2	$8,78 \cdot 10^{10}$
SK-4	9	0,16	88	16	$5,87 \cdot 10^{11}$	6	0,11	78	10,3	$3,88 \cdot 10^{11}$
SK-5	9	0,16	87	18	$6,90 \cdot 10^{11}$	7	0,14	100	15	$5,75 \cdot 10^{11}$
SK-6	9	0,17	90	10	$3,92 \cdot 10^{11}$	5	0,10	74	6	$2,29 \cdot 10^{11}$
C	8	0,16	80	226	$8,48 \cdot 10^{12}$	4	0,08	60	114	$4,30 \cdot 10^{12}$
A	8	0,16	81	75	$2,83 \cdot 10^{12}$	5	0,09	67	43	$1,60 \cdot 10^{12}$
V	8	0,15	81	31	$1,15 \cdot 10^{12}$	5	0,09	70	19	$7,04 \cdot 10^{11}$

4. Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 33 sind die prozentualen Adsorptionen für die Adsorption von Hev b 5 gezeigt. Der Einfluss der Konzentration wird bei $T=RT$ durch Angabe von zwei unterschiedlichen Konzentrationen dargestellt, der Einfluss der Temperatur durch die Darstellung der Ergebnisse für $T=37\text{ °C}$.

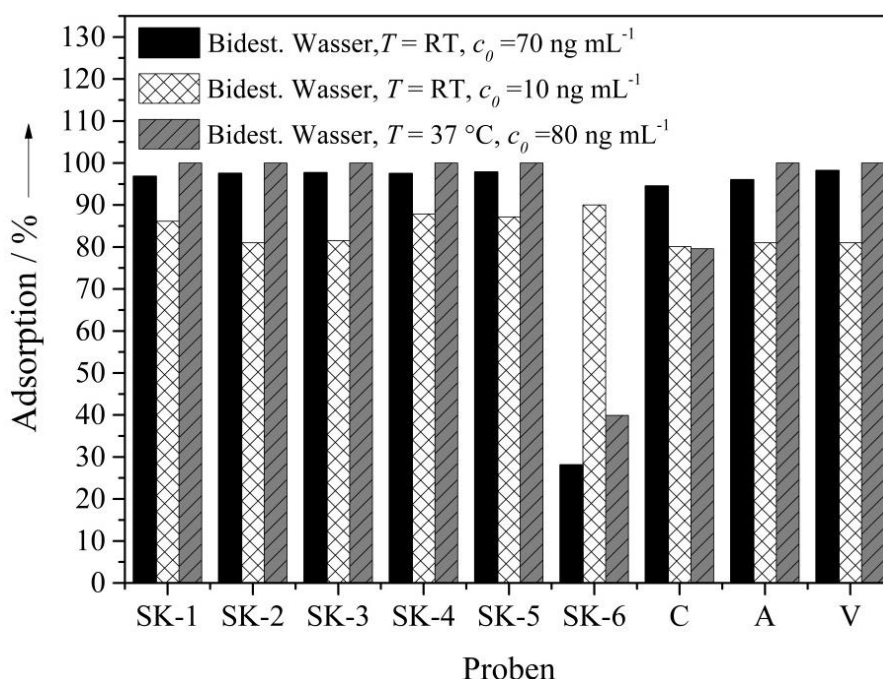


Abbildung 33: Darstellung des Einflusses der Ausgangskonzentration an Allergen und der gewählten Temperatur auf die prozentuale Adsorption von Hev b 5. Schwarz ist die Adsorption von Hev b 5 bei einer Ausgangskonzentration von $c_0=70\text{ ng mL}^{-1}$ dargestellt, weiß die prozentuale Adsorption bei einer niedrigeren Ausgangskonzentration von $c_0=10\text{ ng mL}^{-1}$ und grau die prozentuale Adsorption bei $T=37\text{ °C}$ mit einer Ausgangskonzentration von $c_0=80\text{ ng mL}^{-1}$.

Die Adsorption von Hev b 5 läuft an nahezu allen Calciumcarbonaten mit Ausnahme der Probe SK-6, bei der es sich um die Calcit/Vaterit-Plättchen handelt, vollständig ab. Die prozentualen Adsorptionen liegen sowohl für $T=RT$, als auch für $T=37\text{ °C}$ bei nahezu 100 %. Somit ist die Adsorption von Hev b 5, wie auch schon die Adsorption von Hev b 3, temperaturunabhängig. Der Konzentrationseinfluss ist bei der Adsorption von Hev b 5 weniger stark ausgeprägt als bei der Adsorption von Hev b 3. Lag bei der Adsorption von Hev b 3 die maximale prozentuale Adsorption bei geringer Ausgangskonzentration nur bei ca. 50 %, so ist diese bei Hev b 5 gegenüber der höheren Ausgangskonzentration nur minimal erniedrigt, mit maximalen prozentualen Adsorptionen von ca. 80 %. Durch Variation des Lösungsmittels und Durchführung der

4. Ergebnisse und Diskussion

Adsorptionsexperimente mit PBS konnte ein Einfluss des Lösungsmittels ausgeschlossen werden (Daten im Anhang). Wie auch schon bei den Allergenen Hev b 1 und Hev b 3 ist die Adsorption unabhängig der spezifischen Oberfläche der Phasen. Die Probe SK-6 adsorbiert das Allergen deutlich schlechter als alle weiteren verwendeten Phasen. Da das Allergen an Vaterit (V) adsorbiert, zeigt sich, dass die Morphologie der Probe SK-6 einen Einfluss auf die Adsorption hat und nicht die Polymorphie. Der Einfluss der Morphologie auf die Adsorption wurde bereits in der Literatur beschrieben.^[113–115]

4.1.4.4 Adsorption von Hev b 6.02

Um die unbekannten Konzentrationen von Hev b 6.02 zu bestimmen, musste zunächst eine Kalibriergerade erstellt werden. Dazu wurden definierte Konzentrationen des reinen Allergens mittels ELISA vermessen. Durch eine doppelt-logarithmische Auftragung konnte eine Ausgleichsgerade durch die gemessenen Werte gelegt werden. Um die adsorbierte Konzentration zu erhalten, wurden die gemessenen Absorptionen mit Hilfe der Geradengleichung umgerechnet. Die Kalibriergerade des Allergens Hev b 6.02 ist in Abbildung 34 zu sehen.

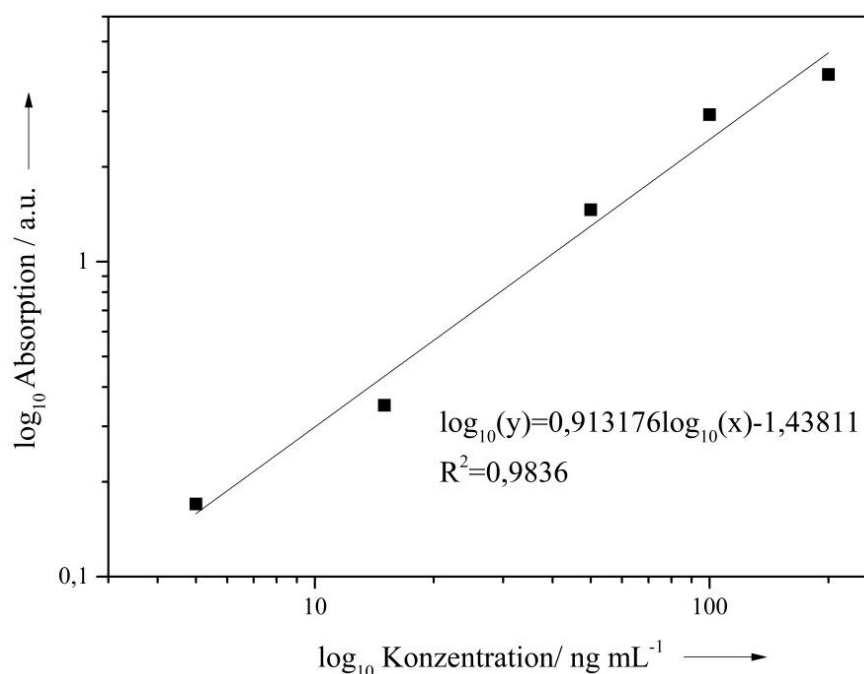


Abbildung 34: Kalibriergerade des Allergens Hev b 6.02 mit angegebener Funktion zur Berechnung der unbekannten Konzentrationen und dem Korrelationskoeffizienten.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Adsorption von Hev b 6.02 sind in den Tabellen 17, 18 und 19 zusammengefasst. Dabei werden die Ergebnisse sowohl für $T=37\text{ °C}$ gezeigt, als auch für $T=RT$ und unterschiedliche Konzentrationen.

Tabelle 17: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 6.02 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). Extraktionsmittel: bidestilliertes Wasser; $T=37\text{ °C}$, $c_o(\text{Hev b 6.02})=75\text{ ng mL}^{-1}$.

Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	57	1,09	76	243	$3,11 \cdot 10^{13}$
SK-2	75	1,59	100	71	$9,06 \cdot 10^{12}$
SK-3	73	1,39	98	35	$4,44 \cdot 10^{12}$
SK-4	75	1,40	100	135	$1,72 \cdot 10^{13}$
SK-5	74	1,43	99	162	$2,08 \cdot 10^{13}$
SK-6	4	0,07	5	4	$5,67 \cdot 10^{11}$
C	0	0	0	0	0
A	42	0,88	56	419	$5,38 \cdot 10^{13}$
V	74	1,52	99	310	$3,97 \cdot 10^{13}$

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 18: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 6.02 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). Extraktionsmittel: bidestilliertes Wasser; $T=\text{RT}$ (links: $c_0(\text{Hev b 6.02})= 105 \text{ ng mL}^{-1}$; rechts: $c_0(\text{Hev b 6.02})= 60 \text{ ng mL}^{-1}$).

	$c_0= 105 \text{ ng mL}^{-1}$					$c_0= 60 \text{ ng mL}^{-1}$				
Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	56	1,19	54	265	$3,40 \cdot 10^{13}$	49	0,92	81	204	$2,62 \cdot 10^{13}$
SK-2	105	1,99	100	89	$1,13 \cdot 10^{13}$	60	1,16	100	51	$6,59 \cdot 10^{12}$
SK-3	102	2,06	98	52	$6,60 \cdot 10^{12}$	60	1,15	99	29	$3,67 \cdot 10^{12}$
SK-4	104	2,07	100	199	$2,56 \cdot 10^{13}$	60	1,14	100	110	$1,40 \cdot 10^{13}$
SK-5	101	2,01	97	228	$2,93 \cdot 10^{13}$	59	1,15	98	131	$1,67 \cdot 10^{13}$
SK-6	0	0	0,	0	0	0	0	0	0	0
C	2	0,03	1	43,68	$5,6 \cdot 10^{12}$	0	0	0	0	0
A	43	0,87	41	414	$5,31 \cdot 10^{13}$	39	0,74	65	352	$4,51 \cdot 10^{13}$
V	101	1,95	96	398	$5,10 \cdot 10^{13}$	60	1,21	99	247	$3,17 \cdot 10^{13}$

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 19: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 6.02 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). Extraktionsmittel: bidestilliertes Wasser; $T=\text{RT}$ (links: $c_0(\text{Hev b 6.02})= 18 \text{ ng mL}^{-1}$; rechts: $c_0(\text{Hev b 6.02})= 9 \text{ ng mL}^{-1}$).

	$c_0= 18 \text{ ng mL}^{-1}$					$c_0= 9 \text{ ng mL}^{-1}$				
Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	17	0,33	96	74	$9,42 \cdot 10^{12}$	9	0,17	98	38	$4,85 \cdot 10^{12}$
SK-2	18	0,34	100	15	$1,95 \cdot 10^{12}$	9	0,18	100	8	$9,95 \cdot 10^{11}$
SK-3	18	0,35	100	9	$1,12 \cdot 10^{12}$	9	0,17	100	4	$5,35 \cdot 10^{11}$
SK-4	18	0,34	100	32	$4,16 \cdot 10^{12}$	9	0,17	100	17	$2,15 \cdot 10^{12}$
SK-5	18	0,33	99	38	$4,87 \cdot 10^{12}$	9	0,17	98	19	$2,45 \cdot 10^{12}$
SK-6	3	0,07	19	4	$5,10 \cdot 10^{11}$	3	0,06	35	4	$4,73 \cdot 10^{11}$
C	4	0,09	25	129	$1,65 \cdot 10^{13}$	5	0,09	56	134	$1,72 \cdot 10^{13}$
A	18	0,36	100	170	$2,17 \cdot 10^{13}$	9	0,17	100	81	$1,03 \cdot 10^{13}$
V	18	0,34	100	69	$8,86 \cdot 10^{12}$	9	0,17	100	34	$4,37 \cdot 10^{12}$

4. Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse der Adsorption von Hev b 6.02 für $T=RT$ für zwei unterschiedlichen Konzentrationen und für $T=37\text{ °C}$ gezeigt.

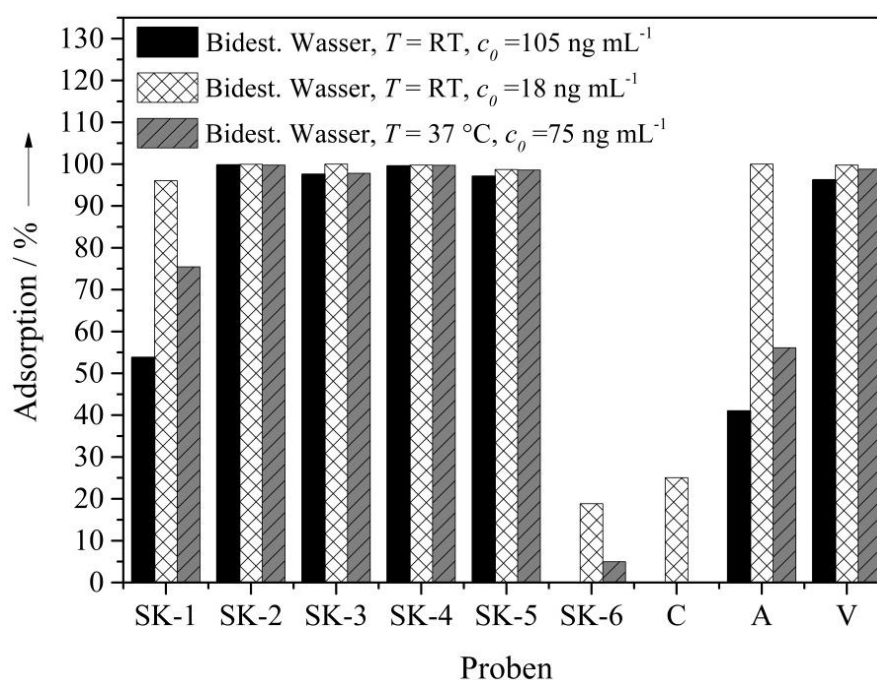


Abbildung 35: Darstellung des Einflusses der Ausgangskonzentration an Allergen und der gewählten Temperatur auf die prozentuale Adsorption. Schwarz ist die Adsorption von Hev b 6.02 bei einer Ausgangskonzentration von $c_0=105\text{ ng mL}^{-1}$ dargestellt, weiß die prozentuale Adsorption bei einer niedrigeren Ausgangskonzentration von $c_0=18\text{ ng mL}^{-1}$ und grau die prozentuale Adsorption bei $T=37\text{ °C}$ mit einer Ausgangskonzentration von $c_0=75\text{ ng mL}^{-1}$.

Die Adsorptionsergebnisse unterscheiden sich für das Allergen Hev b 6.02 deutlich von den Ergebnissen der anderen Allergene. So adsorbiert das Allergen an die Proben SK-6 und Calcit (C) nur gering bzw. gar nicht. Dies konnte auch schon bei der Adsorption von Hev b 5 an SK-6 beobachtet werden. Des Weiteren adsorbiert das Allergen an die Phasen SK-1 und Aragonit (A) deutlich schlechter als an die anderen Proben. Für die anderen Calciumcarbonate liegt die maximale prozentuale Adsorption bei nahezu 100 %. Somit ist die Adsorption von Hev b 6.02 von der Morphologie der Substrate abhängig, allerdings nicht von der spezifischen Oberfläche oder der polymorphen Phase. Für die Anzahl der Proteine pro Quadratmeter Calciumcarbonatoberfläche ergeben sich für alle Allergene ähnliche Ergebnisse, welche unabhängig von der verwendeten Temperatur sind. Die Adsorption von Hev b 6.02 ist sowohl unabhängig von der Ausgangskonzentration, als auch von der Temperatur. Allerdings zeigt sich bei Hev b 6.02 ein nennenswerter Einfluss bei Variation des Mediums (PBS, Daten im Anhang unter 7.1). Die maximale prozentuale

4. Ergebnisse und Diskussion

Adsorption mit PBS als Lösungsmittel lag bei nur ca. 15 %. Dies kann auf die Anwesenheit der Salze bzw. Ionen im PBS zurückgeführt werden, welche einen Einfluss auf die Adsorption des Allergens haben. Hev b 6.02 ist im Gegensatz zu den anderen Allergenen ein sehr kleines Protein, welches aus nur wenigen Aminosäuren besteht. Durch Anwesenheit von Ionen wird dieses Protein möglicherweise komplexiert und somit an der Adsorption gehindert.

Ein weiterer Aspekt bei der Adsorption der allergenen Proteine ist die Anwesenheit weiterer Substanzen, welche bei der Extraktion der Allergene aus dem Naturlatex-Handschuh ebenfalls freigesetzt werden. Es ist bekannt, dass im Naturlatex 1-2 % weitere Proteine, 2 % Harze, 1 % Fettsäuren, 1 % Kohlenhydrate und 0,5 % Anorganische Salze enthalten sind.^[79] Diese weiteren Bestandteile können bei der Freisetzung der Allergene ebenfalls freigesetzt werden und die Adsorptionsergebnisse beeinflussen, indem sie z. B. ebenfalls an die Calciumcarbonatoberflächen adsorbieren oder das Adsorptionsgleichgewicht beeinflussen. Da die Allergene auch aus einem Allergengemisch an die Calciumcarbonate adsorbieren, kommt es zur konkurrierenden Adsorption der verschiedenen Allergene und der weiteren Substanzen, die ebenfalls extrahiert wurden.

Ferner ist die Adsorption von verschiedenen weiteren Parametern abhängig. Forschungen zur Adsorption von Proteinen an Biokeramiken haben ergeben, dass die Adsorption von der Größe, von der Oberflächenladung, von der Stabilität der Proteinstruktur und von der Entfaltungsrates der Proteine abhängig ist.^[116] So haben größere Moleküle mehr Kontraktfläche, mit welcher sie mit der Oberfläche des Adsorbens in Kontakt kommen können. Die Kinetik der Entfaltung führt dabei zu einem schnelleren und besseren Kontakt des Proteins mit der Oberfläche. Dabei adsorbieren hydrophobe Oberflächen, welche ein gewisses Ausmaß an Heterogenität besitzen, besser als ideal glatte Flächen.^[115, 116] Weitere Theorien gehen davon aus, dass Proteine unterschiedliche Konformationen besitzen. So sind sie meist elliptisch, stäbchenförmig, herzförmig (z. B. Bovines Serum Albumin, BSA) oder Y-förmig. In der Lösung rotieren die Proteine frei, während sie an der Oberfläche, je nach Wechselwirkung zwischen der Oberfläche und dem Protein, in spezifischer Orientierung adsorbieren. Durch die Einteilung der amphiphilen Proteine und Oberflächen in hydrophob, hydrophil, negativ geladen und positiv geladen können Voraussagen über die Adsorption von Proteinen an Oberflächen getätigt werden, da die Adsorption immer entgegengerichtet ist. So wird an einer hydrophilen Oberfläche das Protein mit der hydrophoben Orientierung

4. Ergebnisse und Diskussion

adsorbieren.^[117, 118] Ist das Protein strukturell stabil, so kann es entweder *side-on* (mit der langen Achse) oder *end-on* (mit der kurzen Achse) an die Oberfläche adsorbieren. Zu Konformationsänderungen kann es dennoch kommen, da die Freie Energie der Proteine in Lösung nicht gleich der Freien Energie der adsorbierten Proteine ist und dieser Energieunterschied durch Konformationsänderung ausgeglichen werden kann. Daher unterscheidet man „harte“ und „weiche“ Proteine.^[114]

„Weiche“ Proteine, wie z. B. BSA, HSA (Humanes Serum Albumin) oder Hämoglobin, entfalten sich sehr schnell und adsorbieren an die meisten Oberflächen unabhängig von den elektrostatischen Wechselwirkungen aufgrund des Anstiegs der Entropie durch die Konformationsänderung. „Harte“ Proteine, wie z. B. Lysozym oder Ribonuklease, adsorbieren hingegen auf hydrophilen Oberflächen nur in geringem Ausmaß, während die Adsorption an hydrophobe Oberflächen begünstigt ist.^[111]

Die Adsorption ist daher auch von der Oberflächenladung der Mineraloberfläche abhängig. Diese ist eine Funktion des pH-Wertes. So besitzt Calcit eine Oberflächenladung von 0 mV bei einem pH-Wert von 11,5, während die Oberflächenladung bei einem pH-Wert von 7 positiv ist (ungefähr +60 mV).^[118–120]

Auch die Adsorption von Biomolekülen an die polymorphen Calciumcarbonate wird in der Literatur beschrieben. Durch Adsorption von DNA und BSA an die polymorphen Calciumcarbonate und durch Desorption bei unterschiedlichen Bedingungen konnte so ein Trennmechanismus für DNA und BSA entwickelt werden.^[121] Auch die Adsorption kurzkettiger DNA an Calcit wurde schon untersucht.^[122] Ebenso wie die Adsorption von Molekülen unterschiedlicher Größe und Polarisierung an die polymorphen Calciumcarbonate.^[113]

Die Adsorption von Biomolekülen ist auch in der Natur ein sehr wichtiger und häufig zu beobachtender Prozess, da Calciumcarbonat, wie bereits erwähnt, ein sehr wichtiges Biomineral ist. Dabei kommt es zur Kristallisation der Polymorphen aufgrund von Mineral-Protein-Wechselwirkungen. Die dafür benötigten Makromoleküle werden von bestimmten Zellen gebildet und sind für diverse Faktoren der Biomineralbildung wie Keimbildung, Kristallwachstum und Morphologie, verantwortlich. Es wird davon ausgegangen, dass die Wechselwirkung zwischen der Kristalloberfläche und den Makromolekülen von den Strukturen des Kristalls und der Proteine abhängig ist. Das Protein liegt dabei als Sekundärstruktur vor, z. B. als α -Helix und/oder als β -Faltblatt, welche im Weiteren die Tertiärstruktur ausbilden. Aufgrund dieser Raumstruktur sind die Seitenketten maßgeblich für die Eigenschaften des Proteins und die Wechselwirkungen

4. Ergebnisse und Diskussion

mit der Kristalloberfläche verantwortlich. Durch die Adsorption des Proteins an eine spezifische Oberfläche wird das Kristallwachstum gesteuert (siehe Abbildung 36).^[59, 123–126]

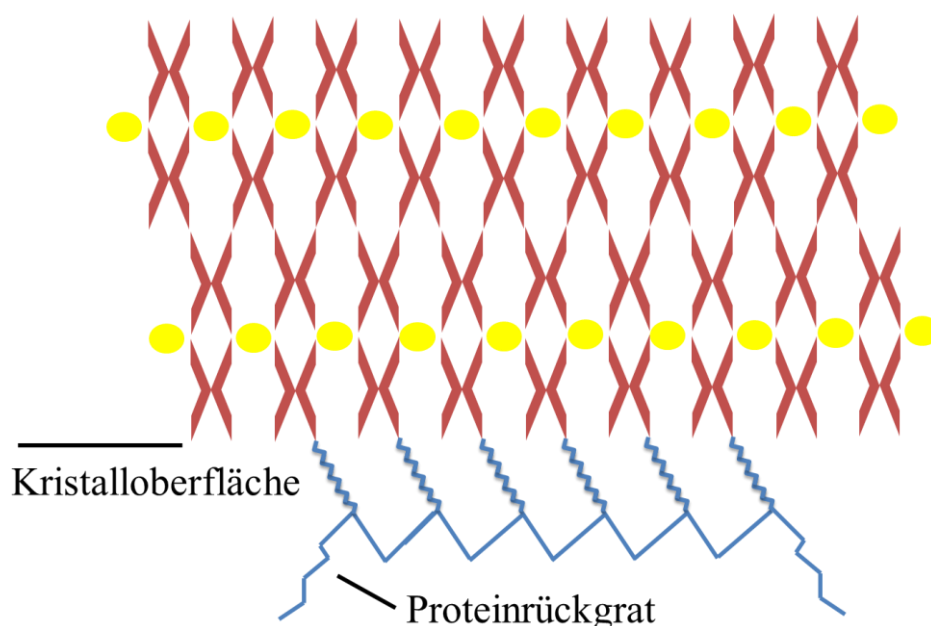


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Mineral-Protein-Wechselwirkungen.^[59]

Ebenso wird die Adsorption von Molekülen bzw. dementsprechend ihrer funktionellen Gruppen an Calciumcarbonat im wässrigen Medium beschrieben. Dabei werden die Wechselwirkungen zwischen dem Adsorbens Calciumcarbonat, zumeist Calcit, und dem Adsorptiv analysiert. Bei den funktionellen Gruppen der organischen Moleküle handelt es sich meist um polare Gruppen wie den funktionellen Gruppen von Alkoholen, Aminosäuren und Carbonsäuren.^[119, 127–132]

4.1.4.5 Einfluss der Adsorption auf die verwendeten Calciumcarbonate

Um den Einfluss der Adsorption auf die Morphologie und Phasenreinheit der Partikel zu untersuchen, wurden die Feststoffe nach den Adsorptionsuntersuchungen abzentrifugiert und getrocknet. Die Morphologie wurde rasterelektronenmikroskopisch untersucht. In den nachfolgenden Abbildungen 37 sind die Aufnahmen der SCHAEFER-KALK-Proben dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

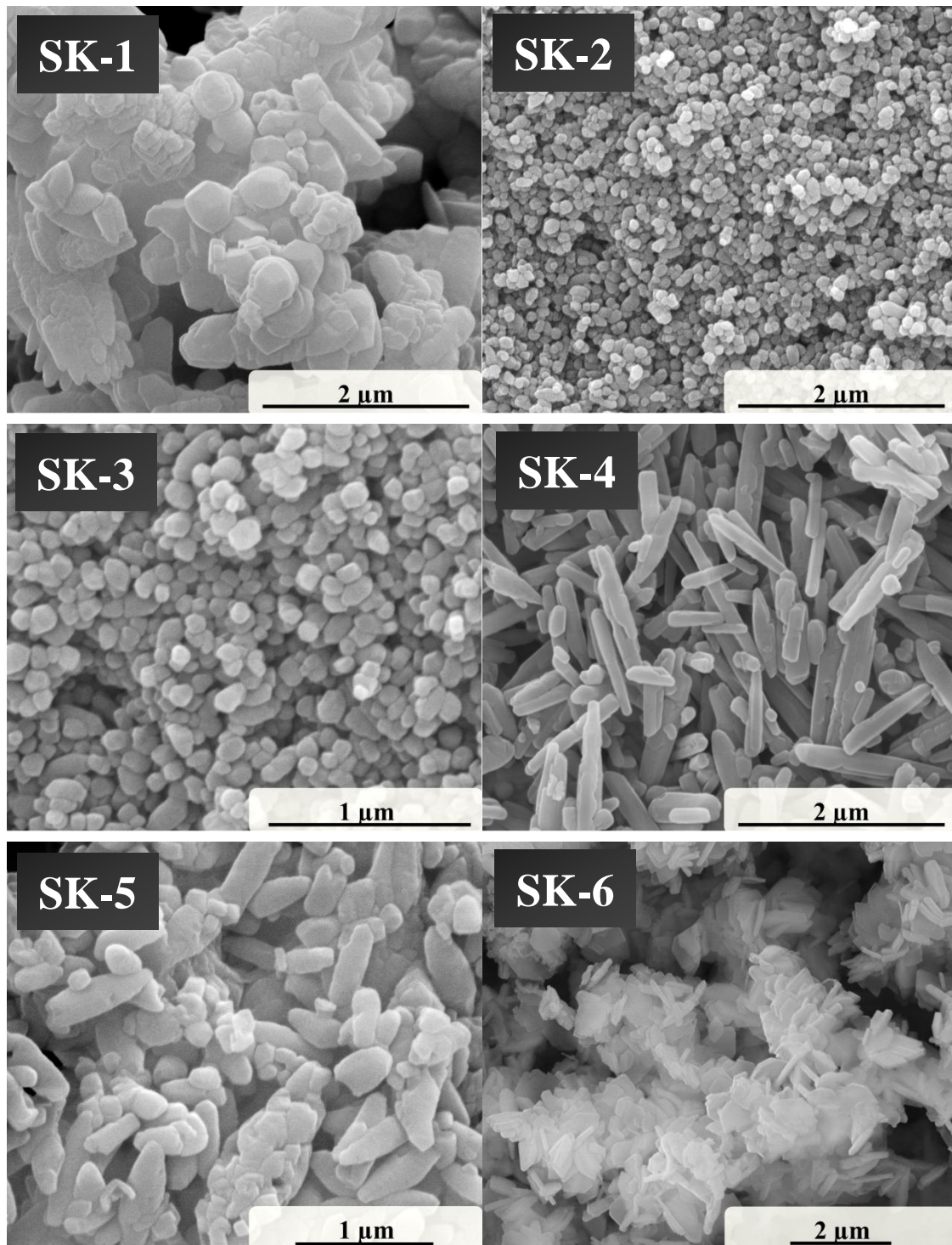


Abbildung 37: REM-Aufnahmen der von SCHAEFER KALK bereitgestellten Proben nach der Adsorption der Allergene aus dem Allergenextrakt für 24 h mit bidestilliertem Wasser bei $T=RT$.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Morphologien der SCHAEFER-KALK-Proben durch die Adsorption der Allergene nicht verändert haben (siehe Absatz 4.1.2.1.1). Man erkennt sowohl die sphärischen Strukturen der Partikel (z. B. SK-3) als auch die Plättchen

4. Ergebnisse und Diskussion

der Calcit/Vaterit-Probe (SK-6). In Abbildung 38 sind die REM-Aufnahmen der selbst dargestellten Proben Calcit (C), Aragonit (A) und Vaterit (V) gezeigt.

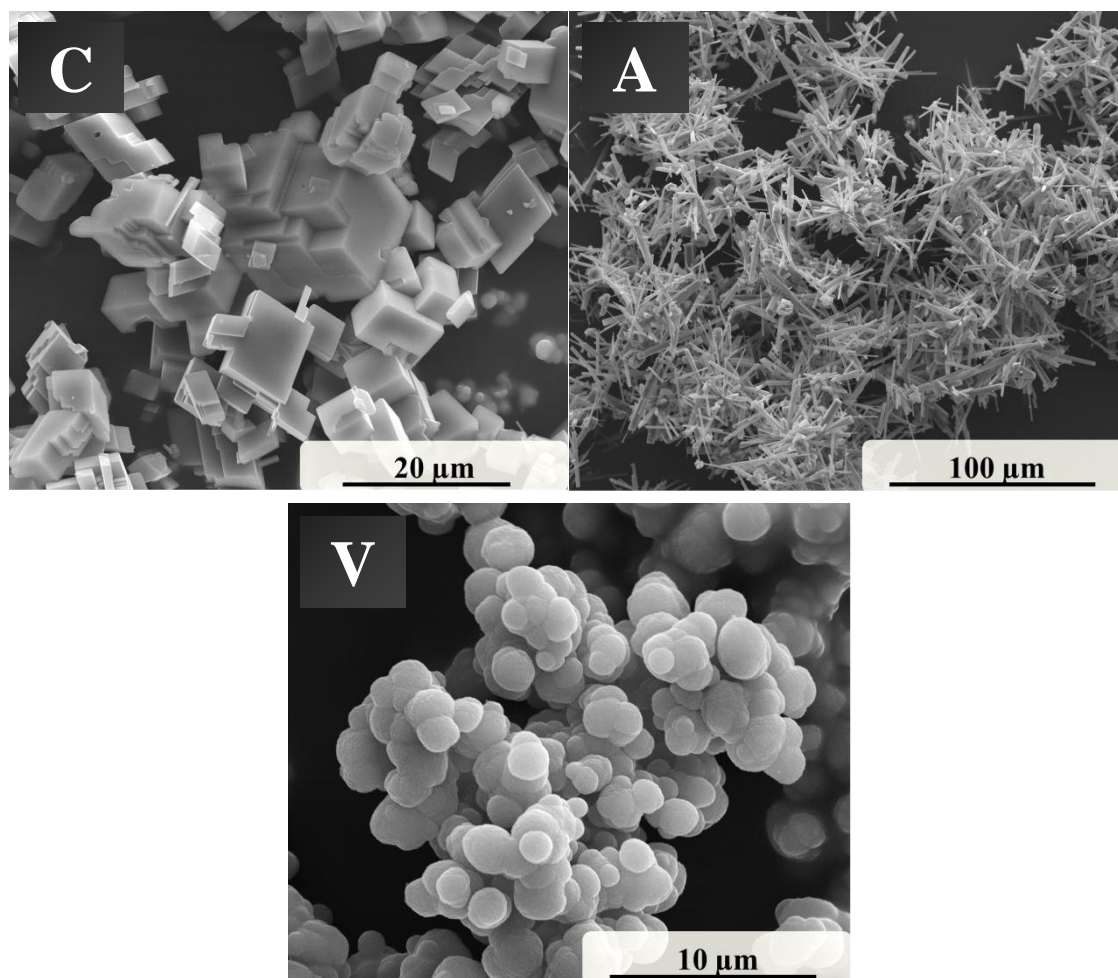


Abbildung 38: REM-Aufnahmen der selbst synthetisierten Proben nach der Adsorption der Allergene aus dem Allergenextrakt für 24 h mit bidestilliertem Wasser bei $T=RT$.

Im Gegensatz zu den SCHAEFER-KALK-Proben lässt sich bei der Aragonit-Probe (Abbildung 38A) erkennen, dass neben den für Aragonit typischen Nadeln auch rhomboedrische Strukturen zu erkennen sind. Bei der ebenfalls metastabilen Phase Vaterit (Abbildung 38V) ist dies nicht zu erkennen. Um die Phasenreinheit zu überprüfen, wurden alle Proben nach der Adsorption getrocknet und im Anschluss mittels Röntgendiffraktometrie untersucht. In Abbildung 39 sind die Diffraktogramme der SCHAEFER-KALK-Proben gezeigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

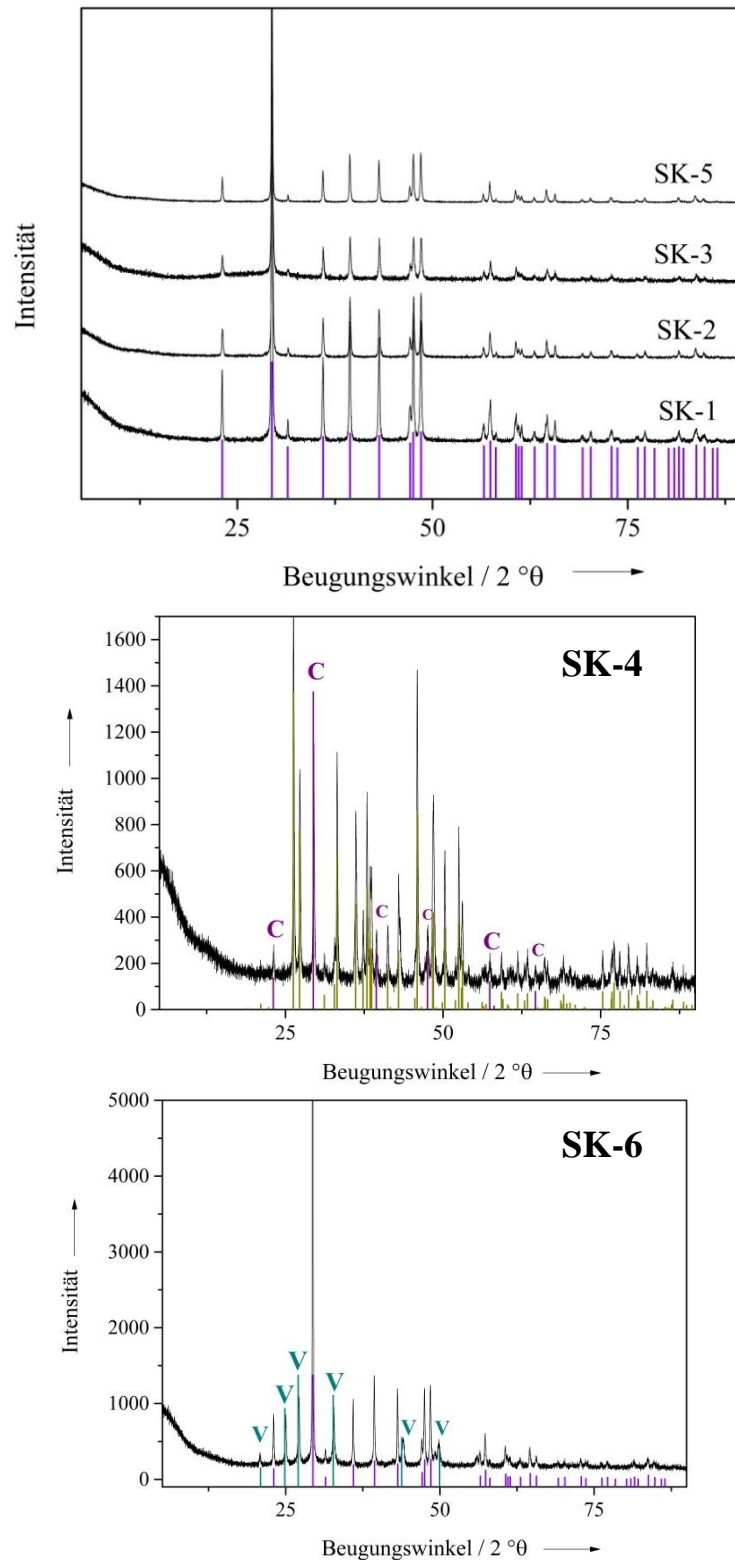


Abbildung 39: Pulverdiffraktogramme der von SCHAEFER KALK bereitgestellten Proben nach der Adsorption. Die lilafarbenen Banden zeigen die Literaturreflexe von Calcit, die grünen von Aragonit und die hellblauen von Vaterit. In den Proben SK-4 und SK-6 sind die Reflexe der weiteren Phasen mit "C" (Calcit) bzw. "V" (Vaterit) hervorgehoben.

4. Ergebnisse und Diskussion

Vergleicht man die Röntgendiffraktogramme aus Abbildung 39 mit denen der Proben vor der Adsorption (siehe Absatz 4.1.2.1.1), so lassen sich keine Unterschiede erkennen. Bei den Proben SK-1, SK-2, SK-3 und SK-5 handelt es sich um phasenreinen Calcit. Die Probe SK-4 zeigt sowohl Reflexe von Aragonit als auch Verunreinigungen durch Calcit (mit „C“ markiert). Die Probe SK-6 lässt sich Calcit zuordnen, welche aber auch Reflexe von Vaterit (mit „V“ markiert) zeigt.

In Abbildung 40 sind die Röntgendiffraktogramme der selbst synthetisierten Proben mit Angabe der Literaturreflexe abgebildet.

4. Ergebnisse und Diskussion

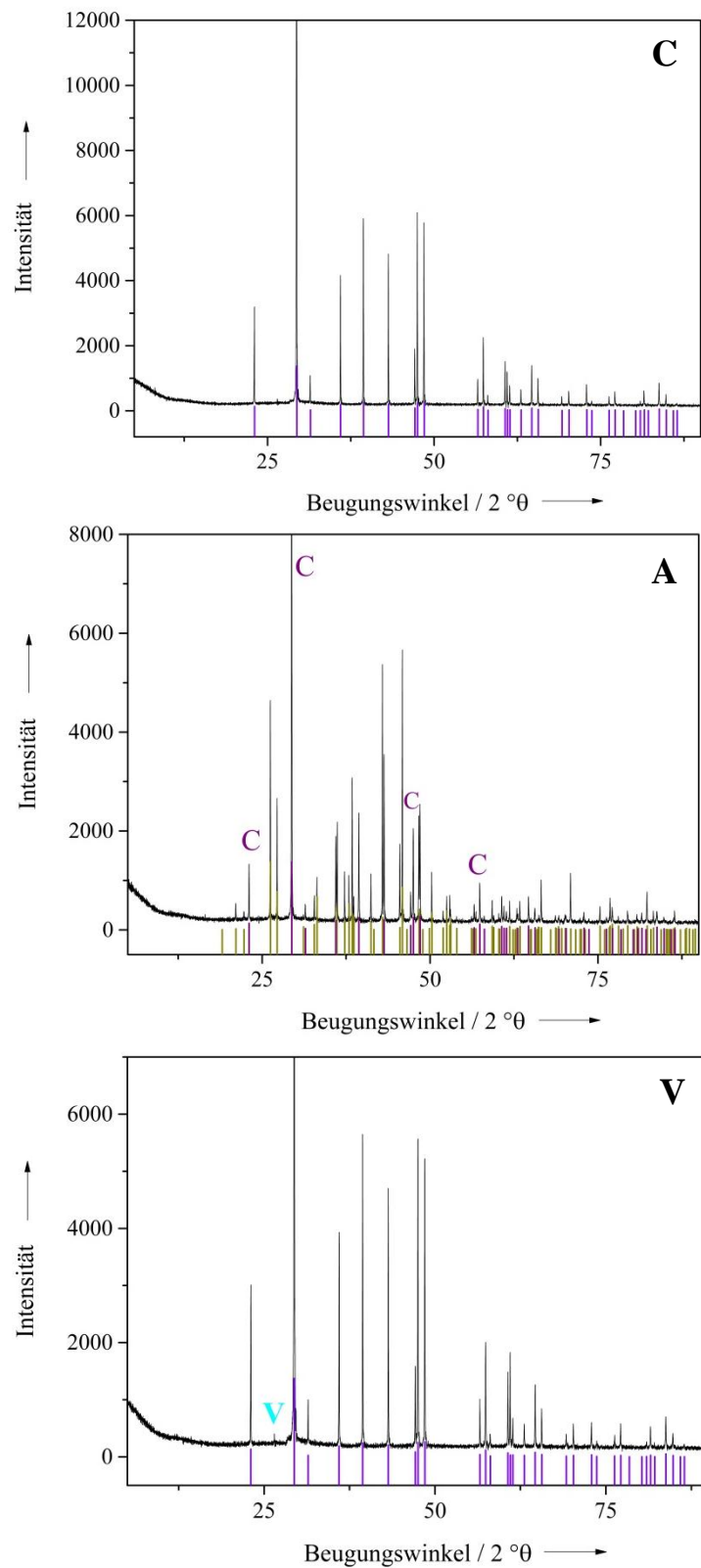


Abbildung 40: Pulverdiffraktogramme der selbst hergestellten Proben Calcit (C), Aragonit (A) und Vaterit (V). Die lilafarbenen Banden zeigen die Literaturreflexe von Calcit (C), die grünen die von Aragonit (A) und die hellblauen die von Vaterit (V).

4. Ergebnisse und Diskussion

Es ist deutlich zu erkennen, dass Calcit (Abbildung 40C) phasenrein vorliegt. Beim zuvor phasenreinen Aragonit (Abbildung 40A) lassen sich auch Reflexe von Calcit (mit „C“ markiert) erkennen, so dass die Adsorptionsexperimente offenbar Auswirkungen auf die Phasenreinheit von Aragonit haben. Die Phasenreinheit von Vaterit (Abbildung 40V) ist nicht mehr gegeben. Mittels Röntgenbeugung lässt sich die Probe Calcit zuordnen. Lediglich ein Reflex (mit „V“ markiert) lässt sich Vaterit zuordnen. Somit kann festgestellt werden, dass die metastabile Phase Vaterit während der Adsorption eine Phasenumwandlung durchläuft, wobei aber die typische sphärische Morphologie von Vaterit erhalten bleibt.

4.1.5 Desorptionsuntersuchungen der Allergene

Da die Allergene nahezu vollständig an die unterschiedlichen Substrate adsorbiert werden konnten, sollten Desorptionsuntersuchungen die Reversibilität oder Irreversibilität der Adsorption belegen. Die Untersuchung der Desorption der vier verschiedenen Allergene von den verschiedenen Calciumcarbonat-Feststoffen sollte untersucht werden. Des Weiteren sollten kleine Naturlatex-Werkstücke hergestellt werden, in welche die verschiedenen Calciumcarbonate beim Herstellungsprozess mit in die Latex-Matrix eingebaut werden sollten. Es ist bekannt, dass sich Calciumcarbonat bei der Fertigung von sogenannten *dipped products* mit bis zu 30 Gew.-% einarbeiten lässt, ohne die mechanischen Eigenschaften wie Dehnbarkeit oder Reißfestigkeit zu beeinflussen.^[106, 107] Anhand der als Handschuhmodell gefertigten Werkstücke sollte die Freisetzung der Allergene aus diesen bzw. die Wirkung der Calciumcarbonate innerhalb der Naturkautschukmatrix nachgewiesen werden.

4.1.5.1 Fertigung der Latex-Werkstücke

Zur Fertigung der Latex-Werkstücke werden folgende Komponenten benötigt.

Komposit-Dispersion: Dispex[®] N40 (0,366 g) wurde in 21 mL bidestilliertes Wasser gegeben und stark durchmischt. Anschließend wurden Zinkoxid (7,04 g), Zinkdiethyldithiocarbamat (ZDEC, 4,68 g) und Schwefel (7,21 g, kolloidal, 80 %ig) hinzugegeben und die Mischung 10 min mittels Ultraschallbad dispergiert. Nach der

4. Ergebnisse und Diskussion

Zugabe von Bentonit (0,24 g) wurde das Gemisch für weitere 5 min im Ultraschallbad behandelt.

Calciumcarbonat-Slurry: Dispex[®] N40 (0,3 g) wurde in 14,7 mL bidestilliertes Wasser gegeben und stark durchmischt. Die entsprechende Calciumcarbonat-Probe (10 g) wurde portionsweise zugegeben und im Ultraschallbad dispergiert.

Koagulant: Zur Darstellung der Koagulanten wurden 40 mL bidestilliertes Wasser und Dispex[®] N40 (0,25 g) vermischt und mit Calciumnitrat-Tetrahydrat (10,19 g) versetzt. Anschließend wurde das jeweilige Calciumcarbonat (0,51 g) hinzugegeben und das Gemisch 15 min im Ultraschallbad behandelt.

Dipping Compound: NRL Latex (33,33 g, 45 %ige Dispersion) wurde mit KOH (75 µL, 2 %ig) auf einen pH-Wert von 9,5-10 gebracht. Nach Zugabe des Calciumcarbonat-Slurry (6 g) und der Komposit-Dispersion (0,75 g) wurde das Gemisch 15 Min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von konzentriertem Ammoniak (210 µL) mit anschließender starker Durchmischung des Gemisches. Nach 24 h bzw. 12 h Reifung (Probe SK-2 flockte bei 24 h Reifung aus) konnte der Dipping Compound verwendet werden. Zur Messung der Referenzallergenkonzentration wurden Werkstücke ohne Calciumcarbonat-Zusatz hergestellt.

Polymer Dip: Es wurden 60 mL bidestilliertes Wasser mit Polyacrylsäure (6,66 g, $M_w=100$ kDa, 35 Gew.-%) versetzt und für 5 min stark durchmischt.

Werkstücke: Zur Darstellung der Werkstücke wurde zunächst die Form mit Wasser gewaschen, auf 75 °C temperiert und für 30 s in den *Koagulant Dip* getaucht (55 °C). Nach Trocknung für 16 s bei 110-120 °C wurde diese für 20 s in die *Dipping Compound* getaucht (RT) und erneut für 9 s bei 110-120 °C getrocknet. Anschließend wurde die Form für 15 s in ein temperiertes Wasserbad getaucht (70-80 °C) und wieder für 15 s bei 110-120 °C getrocknet. Nachdem die Form für 15 s in den *Polymer Dip* getaucht wurde, wurde diese für 30 min bei 110-120 °C getrocknet. Abschließend wurde die Form durch Eintauchen für 15 s in ein Wasserbad gewaschen (70-80 °C) und für 10 min getrocknet (70-80 °C).

Die fertigen Werkstücke konnten im Anschluss von der Form abgezogen werden. In Abbildung 41 sind zwei dargestellte Werkstücke zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

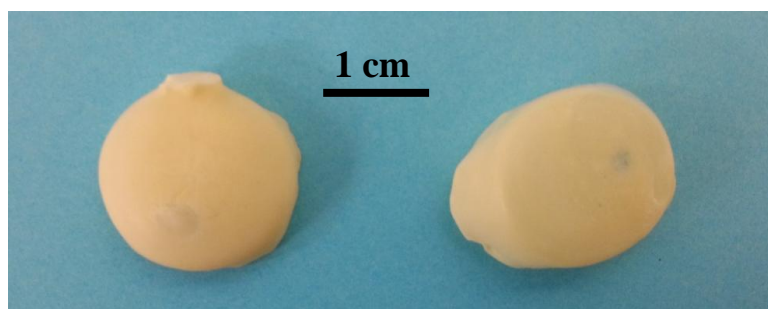


Abbildung 41: Die nach der oben genannten Vorschrift dargestellten Latex-Werkstücke.

4.1.5.2 Durchführung der Desorptionsversuche

Durchführung der Desorptionsversuche vom Calciumcarbonat-Feststoff

Zur Durchführung der Desorptionsversuche wurden ungefähr 50 mg der jeweiligen Calciumcarbonatphase eingewogen und mit 1 mL der allergenhaltigen, wässrigen Lösung versetzt.

Alle Adsorptionsversuche erfolgten wie unter Absatz 4.1.3.2 beschrieben. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und der Feststoff mit 1 mL bidestilliertem Wasser versetzt, durchmischt und erneut bei 755 g für 15 min abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und der Feststoff für die Desorptionsexperimente verwendet.

Die Desorptionsversuche erfolgten sowohl bei $T=RT$ und 37 °C. Dazu wurde der Feststoff mit jeweils 1 mL künstlichem Schweiß oder bidestilliertem Wasser versetzt und kräftig durchmischt. Der künstliche Schweiß wurde nach EN 1811 dargestellt und beinhaltet Natriumchlorid (0,5 %), Milchsäure (0,1 %) und Harnstoff (0,1 %). Der pH-Wert wurde mit konzentriertem Ammoniak auf 5,9 eingestellt.^[133] Die Desorptionsversuche erfolgten für 24 h bei 100 U min⁻¹ auf einem Kreisschüttler. Anschließend wurde der Feststoff quantitativ bei 755 g für 15 min abzentrifugiert und der Überstand mittels ELISA-Assay quantifiziert.

4. Ergebnisse und Diskussion

Durchführung der Freisetzungsversuche mit den selbst dargestellten Latex-Werkstücken

Die Untersuchung der Freisetzung der Allergene aus den selbst gefertigten Latex-Werkstücken erfolgte wie in Absatz 4.1.3.1 beschrieben. Zur Untersuchung der Freisetzungskinetik wurden zudem Freisetzungsversuche bei 80 U min^{-1} mit nicht-zerschnittenen Latex-Werkstücken durchgeführt.

4.1.6 Ergebnisse der Desorptionsversuche vom Feststoff

4.1.6.1 Desorption von Hev b 1

Die Desorption der Hev b 1-Reinsubstanz erfolgte wie unter Absatz 4.1.5.2 beschrieben. Der Allergengehalt wurde mittels ELISA-Assay bestimmt. Um die unbekannte desorbierte Allergenkonzentration zu erhalten, konnten die gemessenen Absorptionen mit Hilfe der Geradengleichung berechnet werden. Durch Einbeziehung der eingewogenen Masse an Calciumcarbonat konnte die desorbierte Masse an Allergen, bezogen auf ein Milligramm Calciumcarbonat, berechnet werden. Weiterhin ließ sich die desorbierte Masse an Allergenen, bezogen auf die spezifische Oberfläche der Partikel, bestimmen, so dass man die desorbierte Masse pro Quadratmeter Oberfläche erhält. Neben diesen Werten ist auch die prozentuale Desorption bezogen auf die desorbierte Konzentration angegeben. Die mittels ELISA bestimmten Ausgangskonzentrationen betrugen für $T=RT$ 152 ng mL^{-1} und für $T=37^\circ\text{C}$ 205 ng mL^{-1} . Die zusammengefassten Ergebnisse sind in Tabelle 20 und 21 dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 20: Angabe der desorbierten Konzentration an Hev b 1 ($c(\text{des})$), der desorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{des})$), der Desorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Des.), der desorbierten Masse bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{des})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{des})$); $T=\text{RT}$, $c_o(\text{Hev b 1})=152 \text{ ng mL}^{-1}$.

	Bidestilliertes Wasser					Künstlicher Schweiß				
Probe	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2
SK-1	75	1,51	49	335	$1,39 \cdot 10^{13}$	70	1,4	46	310	$1,28 \cdot 10^{13}$
SK-2	85	1,72	56	76	$3,15 \cdot 10^{12}$	75	1,52	50	67	$2,79 \cdot 10^{12}$
SK-3	87	1,81	57	45	$1,87 \cdot 10^{12}$	88	1,78	58	44	$1,84 \cdot 10^{12}$
SK-4	66	1,27	43	121	$5,04 \cdot 10^{12}$	85	1,77	56	170	$7,04 \cdot 10^{12}$
SK-5	77	1,59	50	180	$7,47 \cdot 10^{12}$	83	1,67	55	189	$7,83 \cdot 10^{12}$
SK-6	63	1,22	41	73	$3,04 \cdot 10^{12}$	73	1,49	48	90	$3,72 \cdot 10^{12}$
C	59	1,16	39	1651	$6,82 \cdot 10^{13}$	66	1,28	43	1823	$7,53 \cdot 10^{13}$
A	71	1,38	47	657	$2,72 \cdot 10^{13}$	66	1,32	43	626	$2,59 \cdot 10^{13}$
V	82	1,62	54	329	$1,36 \cdot 10^{13}$	67	1,35	44	275	$1,14 \cdot 10^{13}$

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 21: Angabe der desorbierten Konzentration an Hev b 1 ($c(\text{des})$), der desorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{des})$), der Desorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Des.), der desorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{des})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{des})$); $T=37\text{ }^\circ\text{C}$, $c_o(\text{Hev b 1})=205\text{ ng mL}^{-1}$.

	Bidestilliertes Wasser					Künstlicher Schweiß				
Probe	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2
SK-1	74	1,42	36	316	$1,31 \cdot 10^{13}$	69	1,34	34	298	$1,23 \cdot 10^{13}$
SK-2	79	1,55	38	68	$2,85 \cdot 10^{12}$	87	1,67	43	74	$3,06 \cdot 10^{12}$
SK-3	66	1,34	32	33	$1,38 \cdot 10^{12}$	91	1,8	44	44	$1,86 \cdot 10^{12}$
SK-4	81	1,55	39	148	$6,14 \cdot 10^{12}$	73	1,43	35	137	$5,67 \cdot 10^{12}$
SK-5	87	1,77	42	200	$8,30 \cdot 10^{12}$	91	1,8	44	204	$8,47 \cdot 10^{12}$
SK-6	121	2,4	59	145	$6 \cdot 10^{12}$	96	1,85	47	112	$4,64 \cdot 10^{12}$
C	95	1,82	46	2594	$1,07 \cdot 10^{14}$	98	1,89	47	2696	$1,11 \cdot 10^{14}$
A	86	1,66	42	338	$1,4 \cdot 10^{13}$	151	3,07	74	625	$2,59 \cdot 10^{13}$
V	80	1,52	39	725	$3 \cdot 10^{13}$	75	1,43	36	681	$2,82 \cdot 10^{13}$

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Hev b 1-Reinsubstanz desorbiert bei beiden gewählten Temperaturen und Extraktionsmitteln zu ungefähr 50 % von den Oberflächen der Calciumcarbonate. In Abbildung 42 sind die prozentualen Desorptionen zusammenfassend dargestellt.

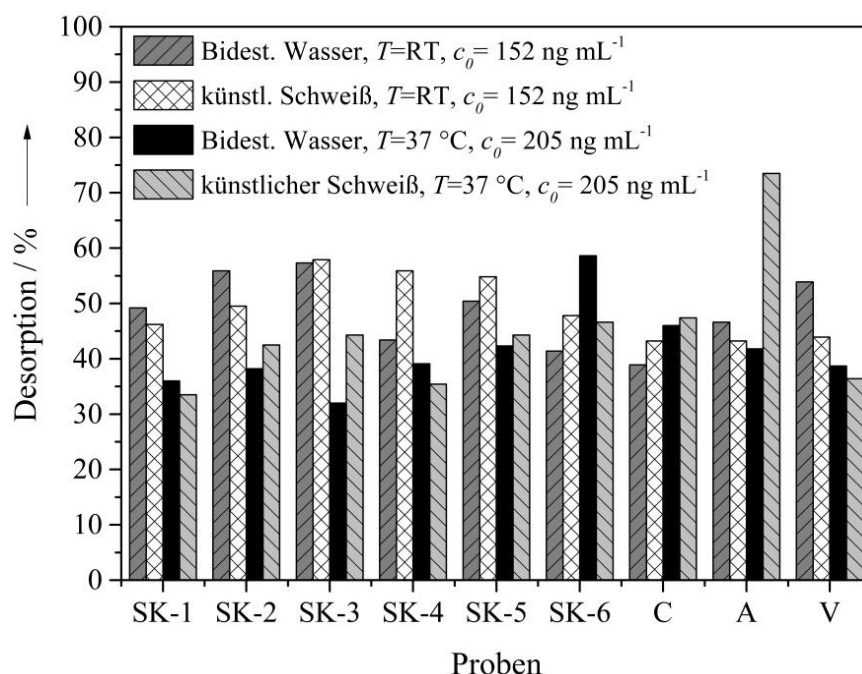


Abbildung 42: Darstellung der Desorptionsergebnisse für das Allergen Hev b 1, sowohl für bidestilliertes Wasser als Extraktionsmittels als auch für künstlichen Schweiß. Des Weiteren sind die Ergebnisse für beide untersuchten Temperaturen gezeigt. Die Referenzkonzentrationen sind in der Abbildung angegeben.

Bei den Ergebnissen für $T=RT$ und bidestilliertes Wasser als Extraktionsmittel lässt sich erkennen, dass die desorbierten Konzentrationen für alle untersuchten Adsorbentien zwischen 59 ng mL^{-1} (C) und 87 ng mL^{-1} (SK-3) liegen. Bezogen auf die Einwaage an Calciumcarbonat ergeben sich für die unterschiedlichen Proben Werte von $1,16 \text{ ng mg}^{-1}$ (C) bis $1,81 \text{ ng mg}^{-1}$ (SK-3). Die desorbierte Masse bezogen auf die Oberfläche der Proben liegt zwischen 45 ng m^{-2} (SK-3) und 1651 ng m^{-2} (C). Vergleicht man die Ergebnisse mit denen für künstlichen Schweiß als Extraktionsmittel und $T=RT$, so lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Die prozentuale Desorption liegt zwischen 43 % (C) und 58 % (SK-3). Die desorbierten Konzentrationen liegen zwischen 66 ng mL^{-1} (C) und 88 ng mL^{-1} (SK-3). Dies lässt den Schluss zu, dass bei der Desorption der Hev b 1-Reinsubstanz die Wahl des Extraktionsmittels keinen Einfluss auf die Desorption hat.

Betrachtet man die Ergebnisse für $T=37 \text{ °C}$, so findet man ähnliche Ergebnisse. So liegen

4. Ergebnisse und Diskussion

die prozentualen Desorptionen für bidestilliertes Wasser zwischen 32 % (SK-3) und 59 % (SK-6), während sie für künstlichen Schweiß zwischen 34 % (SK-1) und 74 % (A) liegen. Die Ergebnisse für die desorbierten Konzentrationen und die desorbierten Massen liegen für alle Polymorphe in einem ähnlichen Wertebereich. Lediglich von der Probe SK-6 desorbiert das Allergen im stärkeren Ausmaß. Schon bei den Adsorptionsversuchen war zu beobachten gewesen, dass die Allergene an die Phase SK-6 deutlich schlechter adsorbierten als an die übrigen Phasen. Diese Beobachtungen konnten mit der speziellen plättchenförmigen Morphologie der Probe in Zusammenhang gebracht werden.

Mit künstlichem Schweiß als Extraktionsmittel finden sich ähnliche Ergebnisse. Allerdings desorbiert Hev b 1 von der Aragonitprobe (A) in deutlich größerem Ausmaß. Bei allen anderen Proben zeigen sich ähnliche Ergebnisse. Die desorbierten Konzentrationen liegen zwischen 69 ng mL^{-1} (SK-1) und 151 ng mL^{-1} (A). Bezieht man die Ergebnisse auf die spezifische Oberfläche der Proben, so erhält man für die desorbierten Massen Werte zwischen 44 ng m^{-2} (SK-3) und 2696 ng m^{-2} (C).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Hev b 1-Reinsubstanz zu ca. 50 % vom Feststoff desorbiert. Die Desorption ist dabei unabhängig vom Extraktionsmittel. Auch eine Temperaturerhöhung führt zu keiner nennenswerten Änderung der Ergebnisse. Lediglich die Verteilung der Ergebnisse ist breiter als bei denen, die bei RT durchgeführt wurden. Ferner ist die Desorption des Allergens unabhängig von der Polymorphie und Morphologie. Da Adsorption und Desorption in einem konzentrationsabhängigen Gleichgewicht (Adsorptionsgleichgewicht) stehen, ist die Desorption des Allergens Hev b 1 zu ungefähr 50 % überraschend, da die Adsorption des Allergens an das Substrat zu nahezu 100 % abläuft, also annähernd kein Adsorptiv mehr im umgebenden Medium vorhanden ist. Durch Wechsel des Mediums, welches ebenfalls adsorptivfrei ist, sollte das Allergen demnach nicht desorbieren, da das konzentrationsabhängige Gleichgewicht nicht verschoben wurde.

Zur Desorption der Proteine von den Calciumcarbonatoberflächen muss ein Energiebeitrag zur Verfügung gestellt werden. Dies geschieht meist durch Variation der Konzentration oder der Temperatur. Diese Parameter wurden bei den Desorptionsuntersuchungen konstant gehalten. Die Proteine, die an Oberflächen adsorbiert sind, befinden sich energetisch in einer Potentialmulde, welche nur durch eine Aktivierungsenergie überbrückt werden kann, sofern die Proteine chemisorbiert sind. Bei Physisorption reichen hingegen oftmals schon Schwingungen der Teilchen um die

4. Ergebnisse und Diskussion

Potentialbarriere zu überbrücken und zu desorbieren.^[29] Diese Theorien befassen sich allerdings eher mit Molekülen und nicht mit Proteinen, welche charakteristische und komplexere Proteinstrukturen ausbilden und mittels unterschiedlichen Mechanismen adsorbieren können. In der Literatur konnte bei Untersuchungen der Adsorption von Insulin und Cytochrom C an Hydroxylapatit die Abhängigkeit der Adsorption und Desorption von der Proteingröße, -struktur und Ladung nachgewiesen werden.^[134] Ähnliche Beobachtungen konnten auch schon bei der Adsorption von Proteinen an Polymeren gemacht werden. Dort zeigte sich, dass die adsorbierten Proteine bei mehrstündigem Kontakt mit dem Desorptionsmedium, von den Oberflächen der Polymere desorbierten.^[135] Des Weiteren gibt es Untersuchungen dazu, dass die Desorption eine Funktion der Adsorption ist und von der Ausgangskonzentration des Proteins abhängt. So ist die Desorptionsrate abhängig von der Adsorptionsschicht, die bei der Adsorption der Proteine entsteht. Geringe Konzentrationen führen zur langsamen Adsorption und zur Entfaltung der Proteine, während hohe Ausgangskonzentrationen zur schnellen Adsorption der Proteine führen und diese am Entfalten hindern.^[110]

4.1.6.2 Desorption von Hev b 3

Um die desorbierte Konzentration an Hev b 3 zu erhalten, konnten die gemessenen Absorptionen mit Hilfe der Geradengleichung (siehe Absatz 4.1.4.2) umgerechnet werden. Durch Einbeziehung der eingewogenen Masse an Calciumcarbonat konnte die desorbierte Masse an Allergen bezogen auf ein Milligramm Calciumcarbonat berechnet werden. Daneben lässt sich die desorbierte Masse an Allergenen, bezogen auf die spezifische Oberfläche der Partikel berechnen, so dass man die desorbierte Masse erhält. Neben diesen Werten sind auch die prozentuale Desorption bezogen auf die desorbierte Konzentration an Allergen und die berechnete Anzahl desorbierter Moleküle pro Quadratmeter Oberfläche angegeben. Die zusammengefassten Ergebnisse sind in den nachstehenden Tabellen 22 und 23 zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 22: Angabe der desorbierten Konzentration an Hev b 3 ($c(\text{des})$), der desorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{des})$), der Desorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Des.), der desorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{des})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{des})$); $T=\text{RT}$, $c_o(\text{Hev b 3})=13 \text{ ng mL}^{-1}$.

	Bidestilliertes Wasser					Künstlicher Schweiß				
Probe	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2
SK-1	2	0,05	18	10	$2,66 \cdot 10^{11}$	5	0,1	37	21	$5,59 \cdot 10^{11}$
SK-2	3	0,05	19	2	$5,85 \cdot 10^{10}$	5	0,1	38	4	$1,14 \cdot 10^{11}$
SK-3	4	0,08	31	2	$5,36 \cdot 10^{10}$	5	0,1	37	2	$6,36 \cdot 10^{10}$
SK-4	4	0,07	28	7	$1,86 \cdot 10^{11}$	4	0,08	31	7	$2,04 \cdot 10^{11}$
SK-5	6	0,12	47	14	$3,70 \cdot 10^{11}$	8	0,17	61	18	$4,97 \cdot 10^{11}$
SK-6	4	0,07	27	4	$1,14 \cdot 10^{11}$	8	0,15	59	9	$2,43 \cdot 10^{11}$
C	4	0,08	27	107	$2,81 \cdot 10^{12}$	7	0,13	48	191	$5,00 \cdot 10^{12}$
A	5	0,10	39	20	$5,42 \cdot 10^{11}$	4	0,07	27	15	$3,92 \cdot 10^{11}$
V	3	0,07	26	32	$8,41 \cdot 10^{11}$	7	0,13	50	62	$1,64 \cdot 10^{12}$

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 23: Angabe der desorbierten Konzentration an Hev b 3 ($c(\text{des})$), der desorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{des})$), der Desorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Des.), der desorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{des})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{des})$); $T=37\text{ }^\circ\text{C}$, $c_o(\text{Hev b 3})=11\text{ ng mL}^{-1}$.

	Bidestilliertes Wasser					Künstlicher Schweiß				
Probe	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2
SK-1	3	0,05	25	11	$3,11 \cdot 10^{11}$	2	0,05	21	9	$2,61 \cdot 10^{11}$
SK-2	1	0,02	10	1	$2,62 \cdot 10^{10}$	2	0,04	17	1	$4,07 \cdot 10^{10}$
SK-3	6	0,13	57	3	$8,40 \cdot 10^{10}$	2	0,04	19	1	$2,73 \cdot 10^{10}$
SK-4	3	0,05	25	5	$1,35 \cdot 10^{11}$	5	0,09	43	8	$2,34 \cdot 10^{11}$
SK-5	1	0,02	9	2	$5,86 \cdot 10^{10}$	5	0,1	44	11	$2,88 \cdot 10^{11}$
SK-6	4	0,07	32	4	$1,11 \cdot 10^{11}$	3	0,06	26	3	$8,72 \cdot 10^{10}$
C	2	0,05	22	65	$1,71 \cdot 10^{12}$	8	0,15	72	219	$5,73 \cdot 10^{12}$
A	6	0,13	59	25	$6,67 \cdot 10^{11}$	6	0,11	45	45	$1,19 \cdot 10^{12}$
V	6	0,11	54	53	$1,41 \cdot 10^{12}$	5	0,1	50	22	$6,00 \cdot 10^{11}$

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Wahl der Temperatur und des Extraktionsmittels haben kaum Einfluss auf die Desorption des Allergens. Die höchste prozentuale Desorption ist bei $T=37\text{ °C}$ und künstlichem Schweiß als Extraktionsmittel nachgewiesen worden (71,8 %, Calcit). In Abbildung 43 ist eine Zusammenfassung der prozentualen Desorption für alle untersuchten Parameter dargestellt.

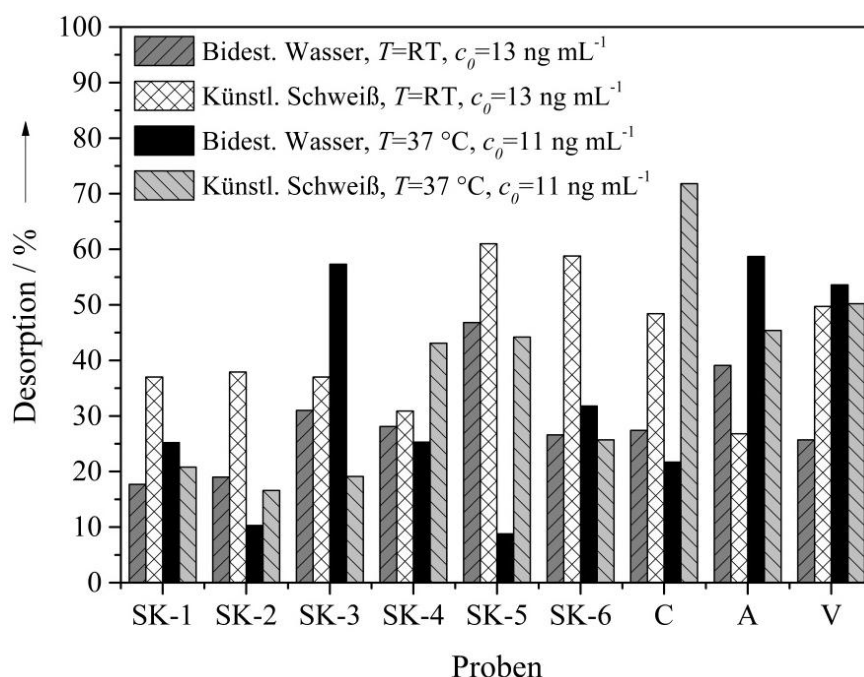


Abbildung 43: Darstellung der Desorptionsergebnisse für das Allergen Hev b 3, sowohl für bidestilliertes Wasser als Extraktionsmittels als auch für künstlichen Schweiß. Des Weiteren sind die Ergebnisse für beide untersuchten Temperaturen gezeigt. Die Referenzkonzentrationen sind in der Grafik angegeben.

Betrachtet man die Ergebnisse für bidestilliertes Wasser und $T=RT$, so ist deutlich zu erkennen, dass das Allergen Hev b 3 von allen Proben teilweise desorbiert. Allerdings erkennt man auch, dass das Allergen von den Proben SK-5 und Aragonit (A) deutlich stärker desorbiert. Dahingegen zeigt sich bei den Proben SK-1 und SK-2 nur eine sehr geringe Desorption. Die desorbierten Konzentrationen liegen zwischen 2 ng mL^{-1} (SK-1) und 6 ng mL^{-1} (SK-5). Die desorbierten Massen liegen zwischen $0,05\text{ ng mg}^{-1}$ (SK-1) und $0,12\text{ ng mg}^{-1}$ (SK-5). Bei der Verwendung von künstlichem Schweiß als Extraktionsmittel und $T=RT$ zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse. So desorbiert das Allergen von den Proben SK-5, SK-6, Calcit (C) und Vaterit (V) deutlich stärker als von den anderen untersuchten Proben. Die desorbierten Konzentrationen liegen zwischen 4 ng mL^{-1} (A) und 8 ng mL^{-1} (SK-5). Die desorbierten Massen liegen zwischen $0,07\text{ ng mg}^{-1}$ (A) und

4. Ergebnisse und Diskussion

0,17 ng mg⁻¹ (SK-5). Somit hat die Wahl des Extraktionsmediums nur einen geringen Einfluss auf die Desorption des Allergens Hev b 3.

Die Desorptionsergebnisse mit künstlichem Schweiß als Extraktionsmittel sind tendenziell höher als die mit bidestilliertem Wasser. Dies kann durch den Salzgehalt im künstlichen Schweiß erklärt werden, wodurch Anionen bzw. Kationen die Desorption des Allergens vom Feststoff begünstigen und das Allergen möglicherweise komplexieren und damit stabilisieren. Eine weitere Möglichkeit wäre das Aussalzen der Proteine aufgrund der Anwesenheit der Ionen.^[136] Weitere Möglichkeiten wären, dass es durch die Anwesenheit der Salze im PBS zur Denaturierung des Proteins kommt.^[109] Diesen Effekt nennt man chemische Denaturierung. Er wird im Allgemeinen auch als „Aussalzen“ bezeichnet. Die sogenannte „Hofmeister-Reihe“ gibt Aufschluss darüber, welchen Einfluss in Wasser gelöste Salze auf Makromoleküle in wässriger Lösung haben. PBS enthält unterschiedliche Anionen und Kationen, welche als Fällungsmittel eingesetzt werden können. Durch Verstärkung von hydrophoben Effekten fördern diese die Proteinaggregation und somit das Ausfällen der Proteine in wässriger Lösung.^[136, 137] Des Weiteren kann die Desorption des Allergens durch elektrostatische Wechselwirkungen begünstigt werden. Die Desorption des Allergens ist im Weiteren unabhängig von der Morphologie und der Polymorphie.

Bei Erhöhung der Temperatur liegen die prozentualen Desorptionen bei Verwendung von bidestilliertem Wasser zwischen 10 % (SK-2) und 59 % (A). Dies entspricht desorbierten Massen zwischen 0,02 ng mg⁻¹ (SK-2) und 0,13 ng mg⁻¹ (A). Die Verwendung von künstlichem Schweiß und die Temperaturerhöhung führen zu Unterschieden im Desorptionsverhalten. So desorbiert das Allergen von den Phasen SK-1, SK-2 und SK-6 kaum. Die prozentualen Desorptionen liegen zwischen 17 % (SK-2) und 72 % (C). Dies entspricht desorbierten Konzentrationen zwischen 2 ng mL⁻¹ (SK-2) und 8 ng mL⁻¹ (V). Es zeigt sich somit eine starke Streuung innerhalb der Ergebnisse, welche auch schon bei T=RT mit künstlichen Schweiß auftrat und durch die Anwesenheit der Salze im künstlichen Schweiß erklärt werden kann. Die Desorption der Allergene von den Calciumcarbonat-Oberflächen konnte schon bei Hev b 1 festgestellt werden und wurde dort bereits diskutiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1.6.3 Desorption von Hev b 5

Um die desorbierte Konzentration an Hev b 5 zu erhalten, konnten die gemessenen Absorptionen mit Hilfe der Geradengleichung (siehe Absatz 4.1.4.3) umgerechnet werden. Durch Einbeziehung der eingewogenen Masse an Calciumcarbonat konnte die desorbierte Masse an Allergen bezogen auf ein Milligramm Calciumcarbonat berechnet werden. Daneben lässt sich die desorbierte Masse an Allergenen, bezogen auf die spezifische Oberfläche der Partikel berechnen, so dass man die desorbierte Masse erhält. Neben diesen Werten sind auch die prozentuale Desorption bezogen auf die desorbierte Konzentration an Allergen und die berechnete Anzahl desorbierter Moleküle pro Quadratmeter Oberfläche angegeben. Die zusammengefassten Ergebnisse sind in den nachstehenden Tabellen 24 und 25 zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 24: Angabe der desorbierten Konzentration an Hev b 5 ($c(\text{des})$), der desorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{des})$), der Desorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Des.), der desorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{des})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{des})$); $T=\text{RT}$, $c_o(\text{Hev b 5})=34 \text{ ng mL}^{-1}$.

	Bidestilliertes Wasser					Künstlicher Schweiß				
Probe	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2
SK-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SK-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SK-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SK-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SK-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SK-6	0,4	0,01	1	0,50	$1,89 \cdot 10^{10}$	13	0,26	38	16	$5,89 \cdot 10^{11}$
C	0	0,	0	0	0	0	0	0	0	0
A	2	0,03	5	6	$2,42 \cdot 10^{11}$	1	0,02	2	4	$1,24 \cdot 10^{11}$
V	0,3	0,01	1	3	$9,83 \cdot 10^{10}$	0,4	0,01	1	4	$1,34 \cdot 10^{11}$

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 25: Angabe der desorbierten Konzentration an Hev b 5 ($c(\text{des})$), der desorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{des})$), der Desorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Des.), der desorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{des})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{des})$); $T=37\text{ }^\circ\text{C}$, $c_o(\text{Hev b 5})=54\text{ ng mL}^{-1}$.

	Bidestilliertes Wasser					Künstlicher Schweiß				
Probe	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2
SK-1	3	0,05	5	11	$3,96 \cdot 10^{11}$	3	0,06	6	14	$5,06 \cdot 10^{11}$
SK-2	3	0,06	5	3	$9,25 \cdot 10^{10}$	3	0,07	6	3	$1,08 \cdot 10^{11}$
SK-3	2	0,04	4	1	$3,87 \cdot 10^{10}$	3	0,06	6	2	$5,49 \cdot 10^{10}$
SK-4	4	0,07	7	7	$2,45 \cdot 10^{11}$	3	0,05	5	5	$1,92 \cdot 10^{11}$
SK-5	3	0,05	5	6	$2,12 \cdot 10^{11}$	3	0,05	5	6	$2,13 \cdot 10^{11}$
SK-6	3	0,05	5	3	$1,17 \cdot 10^{11}$	25	0,49	47	30	$1,11 \cdot 10^{12}$
C	4	0,07	7	106	$3,98 \cdot 10^{12}$	3	0,05	5	78	$2,92 \cdot 10^{12}$
A	5	0,09	9	18	$6,65 \cdot 10^{11}$	3	0,06	6	13	$4,76 \cdot 10^{11}$
V	3	0,06	6	28	$1,07 \cdot 10^{12}$	7	0,14	14	67	$2,5 \cdot 10^{12}$

4. Ergebnisse und Diskussion

Das Allergen Hev b 5 desorbiert im Gegensatz zu den anderen Allergenen bei $T=RT$ von einigen Phasen nicht. Lediglich von drei Phasen desorbiert das Allergen. Bei erhöhter Temperatur desorbiert das Allergen von allen Phasen, jedoch nur in sehr geringem Ausmaß. In Abbildung 44 sind die zusammengefassten Ergebnisse für die prozentuale Desorption gezeigt.

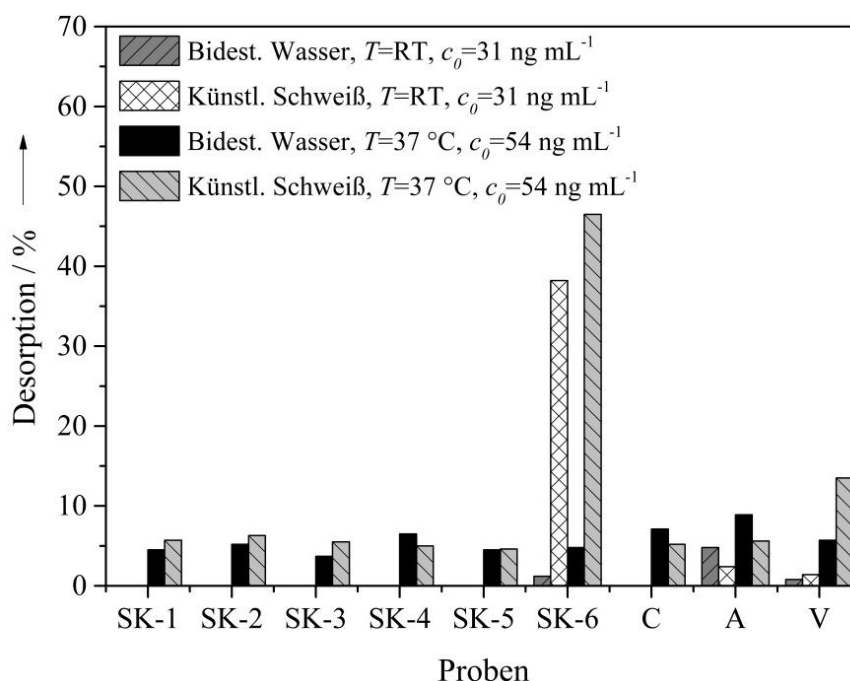


Abbildung 44: Darstellung der Desorptionsergebnisse für das Allergen Hev b 5, sowohl für bidestilliertes Wasser als Extraktionsmittels als auch für künstlichen Schweiß. Des Weiteren sind die Ergebnisse für beide untersuchte Temperaturen gezeigt. Die Referenzkonzentrationen sind in der Grafik angegeben.

In Abbildung 44 ist deutlich zu erkennen, dass das Allergen kaum von den Calciumcarbonaten desorbiert. Nur von den Proben SK-6, Vaterit (V) und Aragonit (A) desorbiert Hev b 5. Bei allen anderen verbleibt das Allergen an der Oberfläche der Substrate adsorbiert. Die Verwendung von bidestilliertem Wasser als Extraktionsmittel führt zu einer maximalen prozentualen Desorption von 5 % (A). Dies entspricht einer desorbierten Konzentration von 2 ng mL^{-1} .

Die Verwendung von künstlichem Schweiß als Extraktionsmittel führt zu ähnlichen Ergebnissen, allerdings desorbiert das Allergen von der Probe SK-6 stärker als von den anderen Phasen. Die prozentuale Desorption liegt bei 38 % (SK-6), was einer desorbierten Konzentration von 13 ng mL^{-1} entspricht. Schon bei den Adsorptionsuntersuchungen verhielt sich die plättchenförmige Probe SK-6 anders im

4. Ergebnisse und Diskussion

Vergleich zu den anderen Calciumcarbonaten. Dies ließ sich mit der Morphologie der Probe in Verbindung bringen.

Bei $T=37\text{ °C}$ und bidestilliertem Wasser desorbiert das Allergen von allen Proben zu weniger als 10 %. Die prozentualen Desorptionen liegen zwischen 4 % (SK-3) und 9 % (A). Dies entspricht desorbierten Konzentrationen von 2 ng mL^{-1} und 5 ng mL^{-1} . Es ist deutlich zu erkennen, dass Hev b 5 von allen Proben nur im geringen Maße desorbiert. Bei Verwendung von künstlichem Schweiß als Extraktionsmittel desorbiert das Allergen lediglich von SK-6, was mit den Ergebnissen aus vorherigen Adsorptions- und Desorptionsversuchen übereinstimmt. Die prozentualen Desorptionen liegen zwischen 5 % (SK-5) und 47 % (SK-6). Dies entspricht desorbierten Konzentrationen von 3 ng mL^{-1} (SK-5) bis 25 ng mL^{-1} (SK-6).

Zusammenfassend wird beim Vergleich der Desorption der bisher untersuchten Allergene deutlich, dass das Allergen Hev b 5 im Gegensatz zu der Hev b 1-Reinsubstanz und Hev b 3 nicht bzw. nur sehr gering von den Calciumcarbonat-Oberflächen desorbiert. Die Temperaturerhöhung führt zur leichten Erhöhung der Desorption, so dass die Desorption von Hev b 5 von der Wahl der Temperatur abhängig ist, allerdings nicht vom Extraktionsmittel. Auch bei diesem Allergen zeigt sich die Phase SK-6, d. h. die plättchenförmige Calcit/Vaterit-Phase, als ungeeignet für den Einsatz als Adsorbens.

4.1.6.4 Desorption von Hev b 6.02

Um die desorbierte Konzentration von Hev b 6.02 zu erhalten, konnten die gemessenen Absorptionen mit Hilfe der Geradengleichung (siehe Absatz 4.1.4.4) umgerechnet werden. Durch Einbeziehung der eingewogenen Masse an Calciumcarbonat konnte die desorbierte Masse an Allergen bezogen auf ein Milligramm Calciumcarbonat berechnet werden. Daneben lässt sich die desorbierte Masse an Allergenen bezogen auf die spezifische Oberfläche der Partikel berechnen, so dass man die desorbierte Masse erhält. Neben diesen Werten sind auch die prozentuale Desorption bezogen auf die desorbierte Konzentration an Allergen und die berechnete Anzahl desorbierter Moleküle pro Quadratmeter Oberfläche angegeben. Die zusammengefassten Ergebnisse sind in den nachstehenden Tabellen 26 und 27 zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 26: Angabe der desorbierten Konzentration an Hev b 6.02 ($c(\text{des})$), der desorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{des})$), der Desorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Des.), der desorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{des})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{des})$); $T=\text{RT}$, $c_o(\text{Hev b 6.02})=25 \text{ ng mL}^{-1}$.

	Bidestilliertes Wasser					Künstlicher Schweiß				
Probe	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2
SK-1	1	0,01	2	3	$3,30 \cdot 10^{11}$	0,2	0	1	1	$9,04 \cdot 10^{10}$
SK-2	0,02	0	0	0,02	$2,35 \cdot 10^9$	0	0	0	0	0
SK-3	0,1	0	0	0,04	$5,49 \cdot 10^9$	0,02	0	0,1	0,01	$9,70 \cdot 10^8$
SK-4	0,1	0	0	0,14	$1,84 \cdot 10^{10}$	0,02	0	0,1	0,04	$5,70 \cdot 10^9$
SK-5	0,03	0	0	0,07	$8,96 \cdot 10^9$	0,02	0	0,1	0,05	$6,89 \cdot 10^9$
SK-6	0,3	0,01	1	0,36	$4,57 \cdot 10^{10}$	0,2	0	1	0,22	$2,88 \cdot 10^{10}$
C	0,3	0,01	1	9	$1,18 \cdot 10^{12}$	0,3	0,01	1	9	$1,13 \cdot 10^{12}$
A	0,3	0,01	1	1	$1,38 \cdot 10^{11}$	0,3	0,01	1	1	$1,64 \cdot 10^{11}$
V	0,2	0	1	2	$2,01 \cdot 10^{11}$	0,3	0,01	1	2	$3,02 \cdot 10^{11}$

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 27: Angabe der desorbierten Konzentration an Hev b 6.02 ($c(\text{des})$), der desorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{des})$), der Desorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Des.), der desorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{des})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{des})$); $T=37\text{ }^\circ\text{C}$, $c_o(\text{Hev b 6.02})=26\text{ ng mL}^{-1}$.

	Bidestilliertes Wasser					Künstlicher Schweiß				
Probe	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2	$c(\text{des})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{des})$ / ng mg^{-1}	Des. / %	$m(\text{des})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{des.})$ / m^2
SK-1	0,4	0,01	1	2	$2,01 \cdot 10^{11}$	0,1	0	0,3	0,34	$4,33 \cdot 10^{10}$
SK-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SK-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SK-4	0,04	0	0,2	0,08	$1,04 \cdot 10^{10}$	0	0		0	0
SK-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SK-6	0,3	0,01	1	0,30	$3,81 \cdot 10^{10}$	0,03	0	0,1	0,03	$4,23 \cdot 10^9$
C	0,7	0,01	3	19	$2,39 \cdot 10^{12}$	0,1	0	0,2	2	$2,05 \cdot 10^{11}$
A	0,3	0,01	1	1	$1,38 \cdot 10^{11}$	0,2	0	1	1	$9,19 \cdot 10^{10}$
V	0,1	0	0,3	1	$7,87 \cdot 10^{10}$	3	0,05	10	23	$3 \cdot 10^{12}$

4. Ergebnisse und Diskussion

Wie in den Tabellen 26 und 27 erkennbar ist, ist auch die Desorption von Hev b 6.02 teilweise nicht erfolgt. Von vielen der verwendeten Proben desorbiert das Allergen nicht. Des Weiteren ist die Desorption nur sehr gering ausgeprägt und beträgt nur wenige Prozent. In Abbildung 45 ist die prozentuale Desorption für alle durchgeführten Versuche gezeigt.

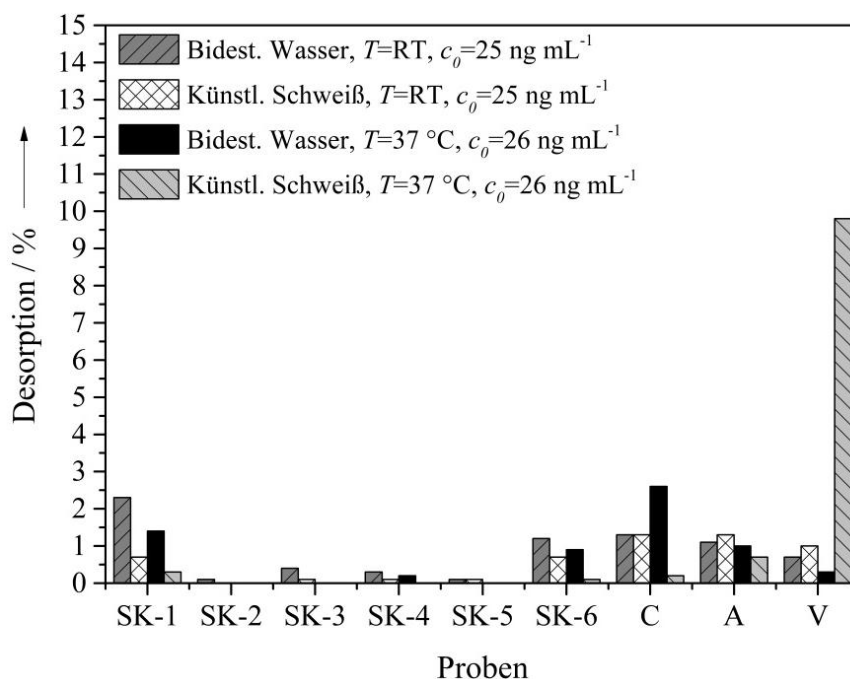


Abbildung 45: Darstellung der Desorptionsergebnisse für das Allergen Hev b 6.02, sowohl für bidestilliertes Wasser als Extraktionsmittels als auch für künstlichen Schweiß. Des Weiteren sind die Ergebnisse für beide untersuchten Temperaturen gezeigt. Die Referenzkonzentrationen sind in der Abbildung angegeben.

Von den verwendeten Proben desorbiert das Allergen im unterschiedlichen Umfang. Die Verwendung von bidestilliertem Wasser als Extraktionsmittel führt zu geringer Desorption von unter 3 %. Beim künstlichen Schweiß als Extraktionsmittel sind die Ergebnisse ähnlich und die maximale Desorption liegt unter 2 %. Von der Phase SK-2 desorbiert das Allergen dabei zu 0,1 % (RT, bidestilliertes Wasser) bzw. gar nicht (RT, künstlicher Schweiß). Die maximale desorbierte Konzentration bei $T=RT$ liegt bei bidestilliertem Wasser als Extraktionsmittel bei $0,6 \text{ ng mL}^{-1}$ (SK-1) und bei künstlichem Schweiß bei $1,3 \text{ ng mL}^{-1}$ (C, A). Die Temperaturerhöhung hat keinen Einfluss auf die Desorption des Allergens. Es ist deutlich sichtbar, dass von den meisten Proben, sowohl bei bidestilliertem Wasser als auch bei künstlichem Schweiß als Extraktionsmittel, das Allergen nicht desorbiert und an der Oberfläche adsorbiert bleibt. Somit ist die

4. Ergebnisse und Diskussion

Desorption unabhängig vom verwendeten Medium. Die maximale desorbierte Konzentration ist $0,7 \text{ ng mL}^{-1}$ (C). Dies entspricht einer desorbierten Masse von $0,01 \text{ ng mg}^{-1}$. Bei künstlichem Schweiß als Extraktionsmittel weicht die eigene Vaterit-Probe (V) deutlich von den anderen Proben ab. Von dieser desorbiert das Allergen zu 10 %. Dies entspricht einer desorbierten Konzentration von 3 ng mL^{-1} . Somit zeigt sich, dass die vier Allergene unterschiedlich von den verwendeten Proben desorbieren. Die Desorption der Allergene Hev b 1 und Hev b 3 kann mit den strukturellen Ähnlichkeiten der Proteine in Zusammenhang gebracht werden, während die Desorption der Allergene Hev b 5 und Hev b 6.02 nur minimal ausgeprägt ist.

4.1.7 Freisetzungsversuche aus den Werkstücken

Zur Untersuchung der Freisetzung der Allergene aus Latex-Produkten, in denen die untersuchten Calciumcarbonate mit in der Latex-Matrix eingebunden sind, wurden kleine Latex-Werkstücke dargestellt, aus denen die Freisetzung der vier allergenen Proteine quantifiziert wurde. Die Latexwerkstücke wurden dabei, wie in Absatz 4.1.5.1 beschrieben, hergestellt. Von den hergestellten Werkstücken wurden zunächst REM-Aufnahmen angefertigt. In Abbildung 46 sind die Aufnahmen der Werkstücke für die SCHAEFER KALK-Proben dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

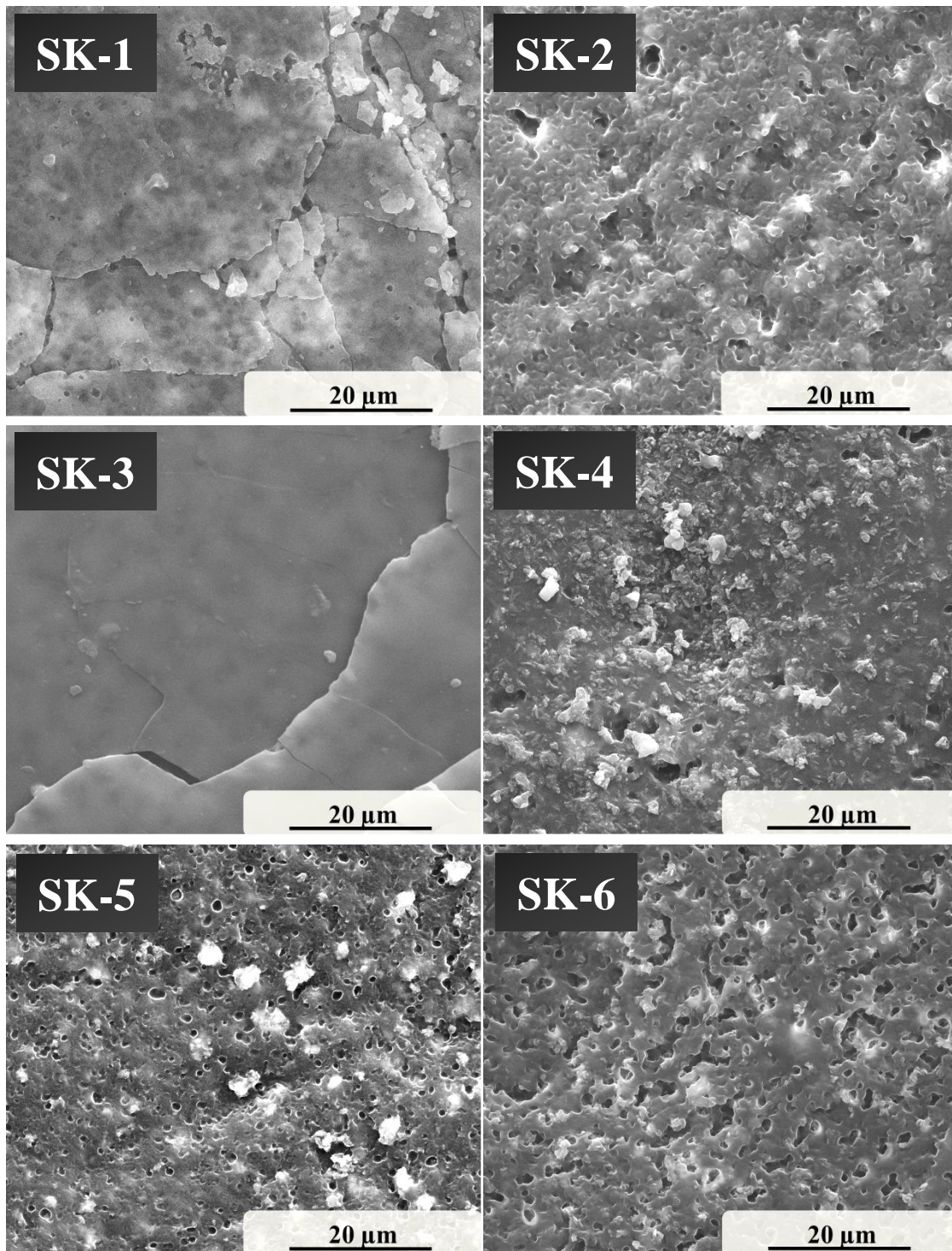


Abbildung 46: REM-Aufnahmen der selbst hergestellten Naturlatex-Werkstücke mit den verschiedenen Calciumcarbonaten der Firma SCHAEFER KALK.

Es ist deutlich zu sehen, dass die verschiedenen Calciumcarbonat-Proben teilweise zu unterschiedlicher Morphologie der Werkstücke führen. So erkennt man bei der Probe SK-3 eine homogene, glatte Oberfläche, während man bei der Probe SK-4 die Aragonit-typischen Nadeln erkennen kann. Die Proben SK-2, SK-5 und SK-6 sind ebenfalls nicht

4. Ergebnisse und Diskussion

homogen, und es sind Poren und der verwendete Feststoff sichtbar. Bei der Probe SK-1 erkennt man den verwendeten Feststoff ebenfalls, allerdings wirkt die Probe deutlich homogener als die Proben SK-2, SK-5 und SK-6.

Die Werkstücke mit den eigenen Calciumcarbonaten wurden ebenfalls mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die zugehörigen Aufnahmen sind in Abbildung 47 zu sehen.

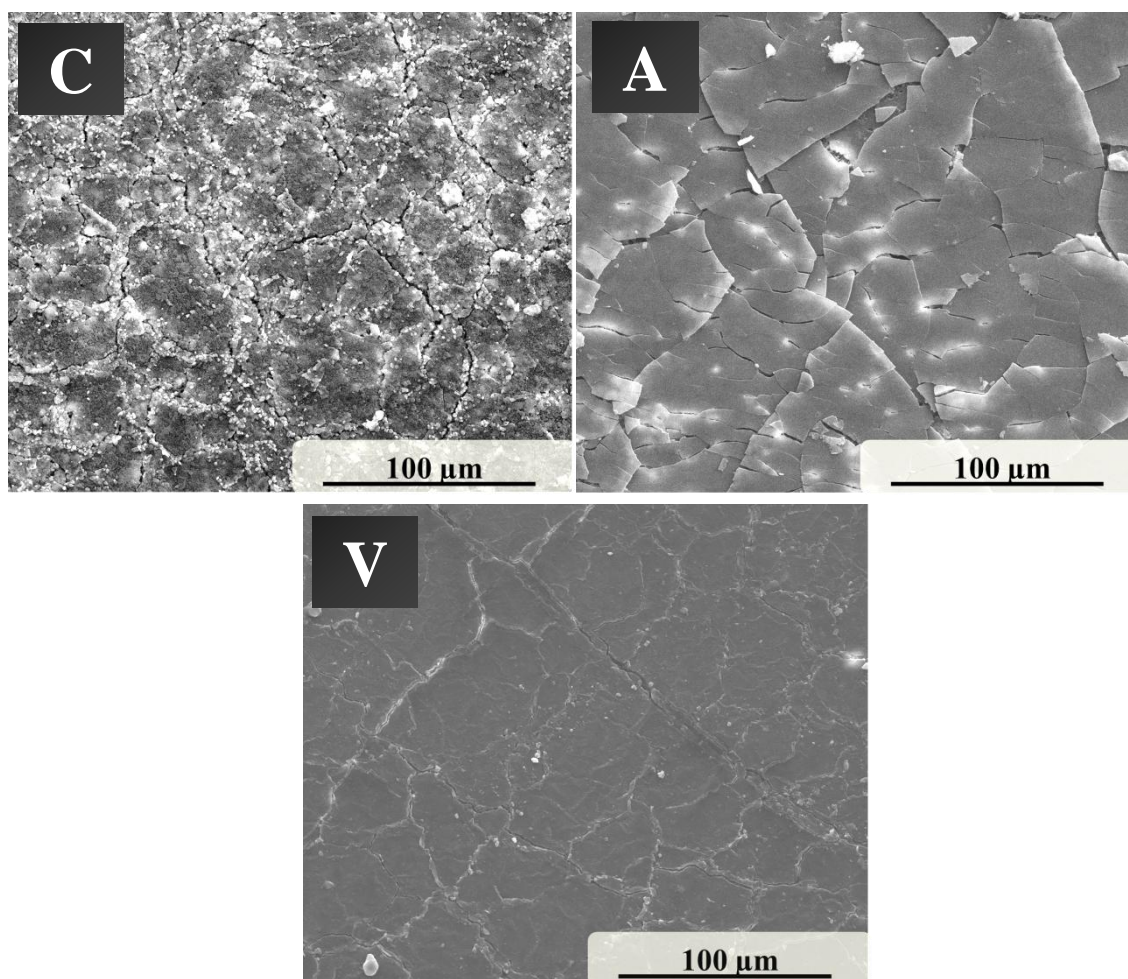


Abbildung 47: REM-Aufnahmen der Latex-Werkstücke mit den polymorphen Calciumcarbonaten Calcit (C), Aragonit (A) und Vaterit (V).

Mit eingebautem Aragonit (A) und Vaterit (V) konnten relativ homogene Oberflächen erzeugt werden, während man bei Verwendung von Calcit (C) deutlich den Feststoff erkennen kann.

Zum Vergleich wurden auch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Latex-Handschuhe der Firma Profissimo aufgenommen. Diese sind in Abbildung 48 zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

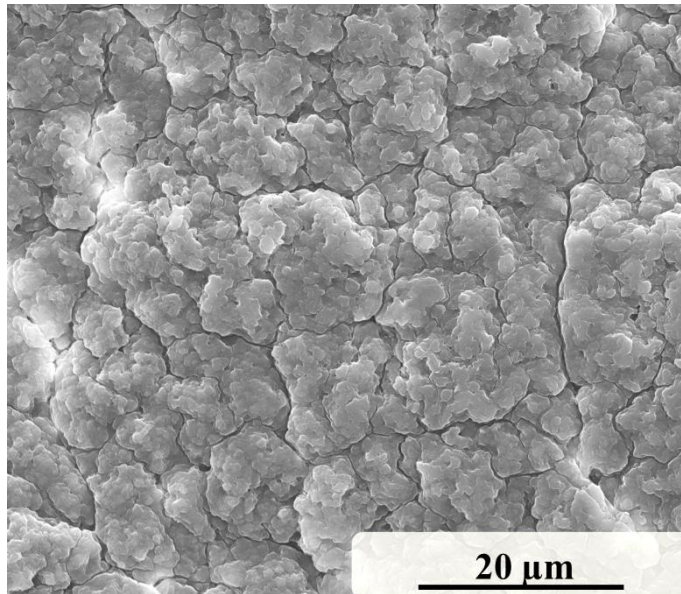


Abbildung 48: REM-Aufnahme des Latex-Handschuhs der Firma Profissimo.

Bei dem gekauften Latex-Handschuh ist keine glatte Oberfläche vorhanden. Die Oberfläche zeigt deutliche kleine Risse und Partikel, die mit in dem Handschuh eingebaut sind oder sich auf der Oberfläche befinden. Zudem wirkt die Oberfläche so inhomogen, dass man davon ausgehen kann, dass die Handschuhe leicht gepudert wurden, obwohl dies vom Hersteller nicht angegeben wurde.

Aus den verschiedenen, selbst dargestellten Werkstücken wurden die Allergene wie in Absatz 4.1.3.1 beschrieben extrahiert und mittels ELISA-Assay quantifiziert.

In der nachfolgenden Tabelle 28 sind die zusammengefassten Ergebnisse für Hev b 1 und bidestilliertem Wasser bzw. künstlichem Schweiß als Extraktionsmittel gezeigt. Die Berechnungen erfolgten bezogen auf die Freisetzungen der Allergene aus Latex-Werkstücken ohne Calciumcarbonatzusatz (c_0).

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 28: Angabe der freigesetzten Konzentration an Hev b 1 ($c(\text{frei})$) und der Freisetzung in Prozent der freigesetzten Allergenmenge ohne Calciumcarbonatzusatz c_0 (Freisetzung). ($c_0(\text{Hev b 1, bidestilliertes Wasser})=221 \text{ ng mL}^{-1}$; $c_0(\text{Hev b 1, künstlicher Schweiß})=239 \text{ ng mL}^{-1}$)

Probe	Bidestilliertes Wasser		Künstlicher Schweiß	
	$c(\text{frei})$ / ng mL^{-1}	Freisetzung / %	$c(\text{frei})$ / ng mL^{-1}	Freisetzung / %
SK-1	187	85	209	87
SK-2	109	49	114	48
SK-3	170	71	207	90
SK-4	200	91	187	78
SK-5	225	94	239	100
SK-6	221	100	239	100
C	138	62	149	63
A	147	67	162	68
V	118	54	115	50

Die freigesetzten Konzentrationen des Allergens Hev b 1 sind unabhängig von der Wahl des Extraktionsmittels und liegen in Bereichen zwischen 109 ng mL^{-1} (SK-2, bidestilliertes Wasser) und 239 ng mL^{-1} (SK-6, künstlicher Schweiß). Bei Verwendung von künstlichem Schweiß als Extraktionsmittel werden ähnliche Ergebnisse erhalten wie bei der Verwendung von bidestilliertem Wasser als Extraktionsmittel. In Abbildung 49 sind die prozentualen Freisetzungen für die Verwendung beider Extraktionsmittel grafisch dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

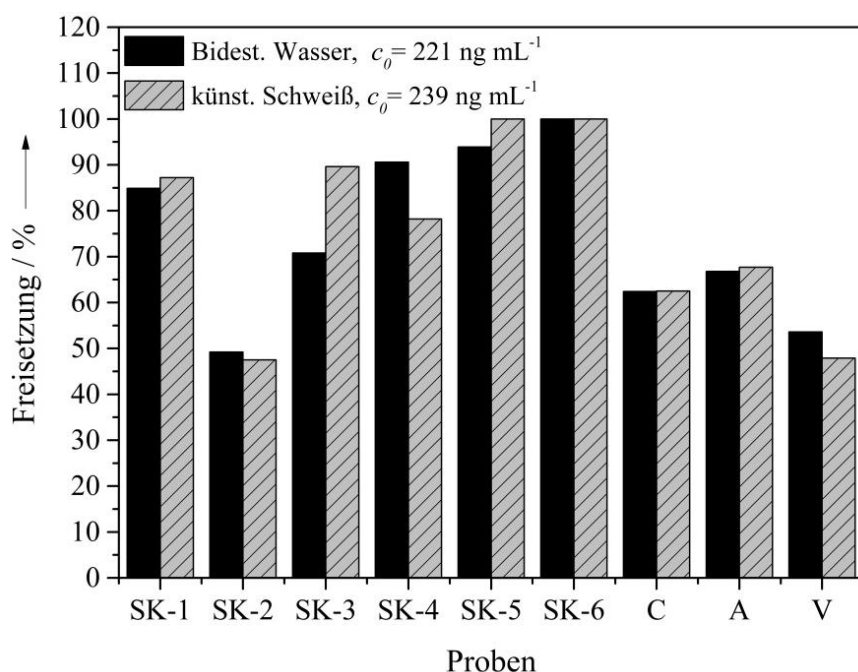


Abbildung 49: Darstellung der prozentualen Freisetzung von Hev b 1 aus den selbst dargestellten Werkstücken bei Verwendung von bidestilliertem Wasser und künstlichem Schweiß als Extraktionsmittel. Die Referenzkonzentrationen für das jeweilige Extraktionsmittel sind in der Abbildung zu sehen.

Das Allergen Hev b 1 wird aus den selbst hergestellten Latex-Werkstücken freigesetzt. So liegt die prozentuale Freisetzung für bidestilliertes Wasser als Extraktionsmittel zwischen 49 % (SK-2) und 100 % (SK-6). Die Freisetzung ist zudem unabhängig vom Extraktionsmittel, von der Morphologie der verwendeten Calciumcarbonate und von der Polymorphie. Nur aus den Werkstücken mit den Proben SK-2 und Vaterit (V) wird das Allergen zu weniger als 50 % freigesetzt. Die Unabhängigkeit der Freisetzung von der Polymorphie und Morphologie konnte schon bei den Desorptionsuntersuchungen von den Feststoffen festgestellt werden (mit Ausnahme der Probe SK-6).

In Tabelle 29 sind die Ergebnisse für die Freisetzung des Allergens Hev b 3 aus den Latex-Werkstücken zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 29: Angabe der freigesetzten Konzentration an Hev b 3 ($c(\text{frei})$) und der Freisetzung in Prozent bezogen auf die freigesetzte Allergenmenge aus Latexwerkstücken ohne Calciumcarbonatzusatz c_0 (Freisetzung). ($c_0(\text{Hev b 3, bidestilliertes Wasser})=62 \text{ ng mL}^{-1}$; $c_0(\text{Hev b 3, künstlicher Schweiß})=78 \text{ ng mL}^{-1}$)

Probe	Bidestilliertes Wasser		Künstlicher Schweiß	
	$c(\text{frei})$ / ng mL^{-1}	Freisetzung / %	$c(\text{frei})$ / ng mL^{-1}	Freisetzung / %
SK-1	62	100	68	87
SK-2	31	49	35	45
SK-3	53	85	59	75
SK-4	62	100	69	88
SK-5	62	100	57	73
SK-6	62	100	64	82
C	29	48	58	74
A	30	49	34	44
V	42	67	36	46

Auch das Allergen Hev b 3 wird aus den Latex-Werkstücken mit eingebauten Calciumcarbonaten freigesetzt. Die freigesetzten Konzentrationen unter Verwendung von bidestilliertem Wasser liegen zwischen 29 ng mL^{-1} (C) und 62 ng mL^{-1} (SK-1, SK-4, SK-5, SK-6). Bei künstlichem Schweiß erhält man freigesetzte Konzentrationen von 34 ng mL^{-1} (A) und 69 ng mL^{-1} (SK-4). Somit ist die Freisetzung des Allergens unabhängig vom Extraktionsmedium. In Abbildung 50 ist die prozentuale Freisetzung von Hev b 3 für bidestilliertes Wasser und künstlichen Schweiß grafisch abgebildet.

4. Ergebnisse und Diskussion

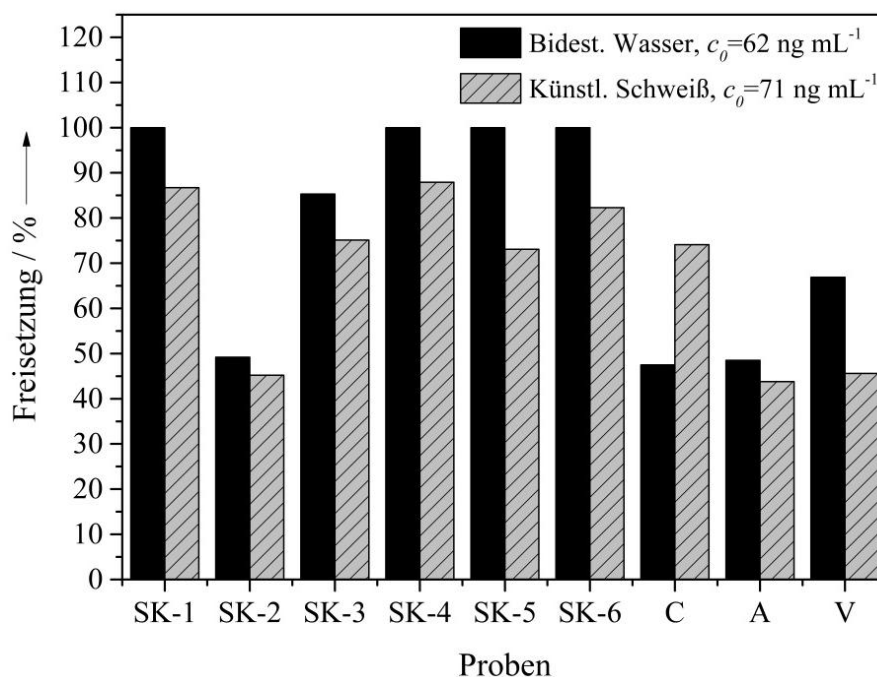


Abbildung 50: Darstellung der prozentualen Freisetzung von Hev b 3 aus den selbst dargestellten Werkstücken bei Verwendung von bidestilliertem Wasser und künstlichem Schweiß als Extraktionsmittel. Die Referenzkonzentrationen für das jeweilige Extraktionsmittel sind in der Abbildung angegeben.

Die Verteilung der Ergebnisse ist breit. So gibt es Proben, aus denen das Allergen vollständig freigesetzt wird und andere Phasen, bei denen das Allergen lediglich zu etwa 50 % freigesetzt wird. Von vielen der verwendeten Calciumcarbonate desorbiert das Allergen Hev b 3 zu nahezu 100 %. Calcit (C) zeigt bei Verwendung von künstlichem Schweiß eine deutlich höhere Freisetzung des Allergens als bei bidestilliertem Wasser. Die Freisetzung des Allergens Hev b 3 ist somit ebenfalls unabhängig von der Polymorphie und Morphologie der in den Latex-Werkstücken befindlichen Calciumcarbonate. In der nachfolgenden Tabelle 30 sind die Ergebnisse für das Allergen Hev b 5 zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 30: Angabe der desorbierten Freisetzung an Hev b 5 ($c(\text{frei})$) und der Freisetzung in Prozent der freigesetzten Allergenmenge ohne Calciumcarbonatzusatz c_0 (Freisetzung). ($c_0(\text{Hev b 5, bidestilliertes Wasser})=18 \text{ ng mL}^{-1}$; $c_0(\text{Hev b 5, künstlicher Schweiß})=14 \text{ ng mL}^{-1}$)

Probe	Bidestilliertes Wasser		Künstlicher Schweiß	
	$c(\text{frei})$ / ng mL^{-1}	Freisetzung / %	$c(\text{frei})$ / ng mL^{-1}	Freisetzung / %
SK-1	18	100	7	50
SK-2	13	74	11	77
SK-3	18	100	14	96
SK-4	18	100	14	100
SK-5	18	100	14	100
SK-6	14	79	9	68
C	18	99	14	100
A	15	80	12	85
V	13	74	12	83

Die Freisetzungsuntersuchungen des Allergens Hev b 5 aus selbst dargestellten Werkstücken liefern nicht so stark schwankende Ergebnisse wie die Allergene Hev b 1 und Hev b 3. Trotz eingebauten Calciumcarbonaten wird das Allergen Hev b 5 aus den meisten Werkstücken zu 100 % freigesetzt. Die freigesetzten Konzentrationen für bidestilliertes Wasser liegen zwischen 13 ng mL^{-1} (SK-2) und 18 ng mL^{-1} (SK-1, SK-3, SK-4, SK-5). Bei künstlichem Schweiß erhält man Ergebnisse zwischen 7 ng mL^{-1} (SK-1) und 14 ng mL^{-1} (SK-4, SK-5, C). Somit ist auch die Freisetzung des Allergens unabhängig vom Extraktionsmedium, der polymorphen Phase und der Morphologie der Partikel. In Abbildung 51 ist die prozentuale Desorption für beide verwendeten Extraktionsmittel in einer Grafik dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

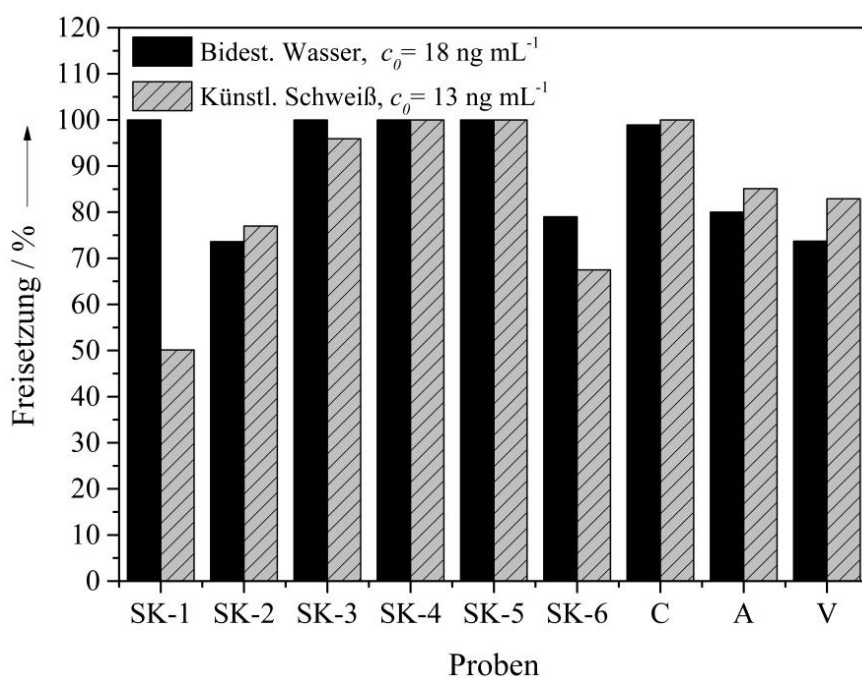


Abbildung 51: Darstellung der prozentualen Desorption von Hev b 5 aus den selbst dargestellten Werkstücken bei Verwendung von bidestilliertem Wasser und künstlichem Schweiß als Extraktionsmittel. Die Referenzkonzentrationen für das jeweilige Extraktionsmittel sind in der Abbildung zu sehen.

Das Allergen Hev b 5 wird aus den Phasen SK-1, SK-3, SK-4, SK-5 und Calcit (C) unter Verwendung von bidestilliertem Wasser als Extraktionsmittel zu 100 % freigesetzt. Die geringste prozentuale Freisetzung beträgt 50 % für die Phase SK-1. Die Freisetzung des Allergens Hev b 5 ist somit vergleichbar mit den Freisetzungen der Allergene Hev b 1 und Hev b 3. In der nachfolgenden Tabelle 31 sind die Ergebnisse für das Allergen Hev b 6.02 dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 31: Angabe der freigesetzten Konzentration an Hev b 6.02 ($c(\text{frei})$) und der Desorption in Prozent der freigesetzten Allergenmenge ohne Calciumcarbonatzusatz c_o (Freisetzung). ($c_o(\text{Hev b 6.02, bidestilliertes Wasser})=140 \text{ ng mL}^{-1}$; $c_o(\text{Hev b 6.02, künstlicher Schweiß})=134 \text{ ng mL}^{-1}$)

Probe	Bidestilliertes Wasser		Künstlicher Schweiß	
	$c(\text{frei})$ / ng mL^{-1}	Freisetzung / %	$c(\text{frei})$ / ng mL^{-1}	Freisetzung / %
SK-1	123	88	72	54
SK-2	90	65	87	65
SK-3	130	97	89	67
SK-4	76	54	47	35
SK-5	54	39	27	20
SK-6	62	44	44	33
C	75	54	71	43
A	89	64	87	65
V	85	61	87	65

Die Ergebnisse für die Freisetzung von Hev b 6.02 variieren für die verschiedenen Calciumcarbonate und die prozentualen Freisetzungen liegen zwischen 20 % und 97 %. Somit ist die Breite der Verteilung der Ergebnisse noch größer als bei den Allergenen Hev b 1, Hev b 3 und Hev b 5. Die freigesetzten Konzentrationen liegen für bidestilliertes Wasser als Extraktionsmittel zwischen 39 ng mL^{-1} (SK-5) und 130 ng mL^{-1} (SK-3). Für künstlichen Schweiß erhält man Werte zwischen 47 ng mL^{-1} (SK-4) und 89 ng mL^{-1} (SK-3). In Abbildung 52 ist die prozentuale Desorption für bidestilliertes Wasser und künstlichen Schweiß als Extraktionsmittel gezeigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

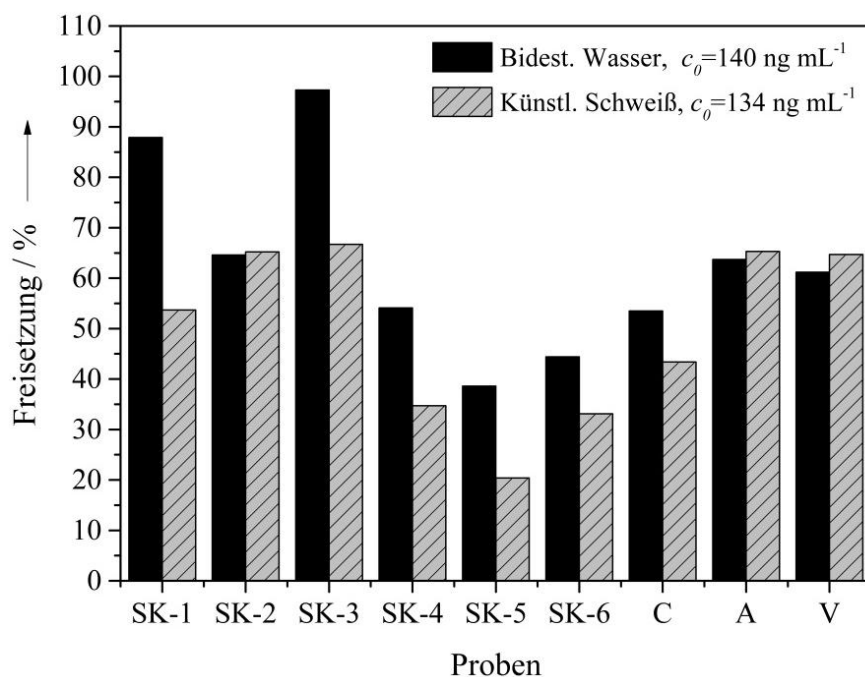


Abbildung 52: Darstellung der prozentualen Freisetzung von Hev b 6.02 aus den selbst dargestellten Werkstücken bei Verwendung von bidestilliertem Wasser und künstlichem Schweiß als Extraktionsmittel. Die Referenzkonzentrationen für das jeweilige Extraktionsmittel sind in der Abbildung zu sehen.

Mit Ausnahme der Phasen SK-1 und SK-3 ist die Freisetzung des Allergens unabhängig vom Extraktionsmittel. Des Weiteren ist die Freisetzung ebenfalls von der Morphologie und der Polymorphie der Calciumcarbonate unabhängig. Vergleicht man nun die Ergebnisse der Freisetzung der Allergene aus den selbst dargestellten Latex-Werkstücken mit denen der Desorption von den Feststoffen, so sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Die maximale prozentuale Desorption von Hev b 1 und Hev b 3 vom Feststoff lag bei 59 %. Dahingegen wurden diese Allergene aus den gefertigten Werkstücken zu 50 % bis 100 % freigesetzt, so dass die Freisetzung der Allergene aus den gefertigten Modell-Handschuhen im Gegensatz zur Desorption vom Feststoff nennenswert erhöht ist. Ähnlich ist dies bei Hev b 5. Die maximale prozentuale Desorption von den Feststoffen lag bei 9 % (mit Ausnahme der Phase SK-6 bei Verwendung von künstlichem Schweiß). Dahingegen ist die prozentuale Freisetzung von Hev b 5 aus den gefertigten Werkstücken deutlich erhöht mit Freisetzungen von 50 % bis 100 %. Die Desorption von Hev b 6.02 vom Feststoff findet bei vielen verwendeten Phasen nicht statt. Die maximale Desorption lag unterhalb von 3 % (mit Ausnahme von Vaterit (V) bei künstlichem Schweiß). Die Freisetzung von Hev b 6.02 aus den Werkstücken liefert Ergebnisse zwischen 35 % und

4. Ergebnisse und Diskussion

100 %. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Freisetzung der Allergene aus den Werkstücken im Vergleich zur Desorption vom Feststoff stark erhöht ist. Aufgrund der Vielzahl weiterer Substanzen, die bei der Fertigung der Werkstücke verwendet werden, ist es schwierig, Erklärungen für diese Beobachtungen und Ergebnisse zu finden. Eine mögliche Erklärung ist die Affinität des Dispergierungsmittels Dispex[®] N40, einem Polymer, zum Calciumcarbonat. Dispex[®] N40 ist das Natriumsalz der Polyacrylsäure und besitzt somit negative Oberflächenladung. Bei der Darstellung der Werkstücke wird es zur Dispergierung der Calciumcarbonate im wässrigen Medium verwendet. Wie im nachfolgenden Absatz 4.2 noch gezeigt wird, besitzen positiv geladene Polymere oder Biomoleküle hohe Affinität zu Calciumcarbonat. Mit solchen Polymeren/Biomolekülen lassen sich auch Nanopartikel durch Adsorption jener an die Oberfläche der Calciumcarbonate funktionalisieren und über längeren Zeitraum stabilisieren. So konnte auch schon gezeigt werden, dass es möglich ist, Calciumcarbonat-Nanopartikel mit dem negativ geladenen Polymer Polystyrolsulfonat (PSS) zu funktionalisieren.^[138] Durch die Adsorption des Dispergierungsmittels an die Oberfläche der Phasen sind diese möglicherweise nicht mehr frei zugänglich für die Allergene, so dass diese nicht an die Oberflächen adsorbieren können und somit als Folge aus den Werkstücken freigesetzt werden.

Um den Einfluss des Dispergierungsmittel zu untersuchen, wurden weitere Werkstücke dargestellt, bei denen das Calciumcarbonat nicht mittels Dispex[®] N40 dispergiert und vor der 24-stündigen Reifung hinzugegeben wurde, sondern direkt vor dem Darstellungsprozess der Werkstücke. Dies sollte verhindern, dass das Dispex[®] N40 die Oberfläche des Calciumcarbonats belegt und die Adsorption der Allergene somit nicht ermöglicht. Dafür wurde die Probe SK-1 verwendet. Die anschließende Extraktion erfolgte wie in Absatz 4.1.5.2 beschrieben. In der nachfolgenden Tabelle 32 sind die Ergebnisse der Quantifizierung dargestellt. Die Referenzkonzentrationen betrugen für bidestilliertes Wasser als Extraktionsmittel für Hev b 1 221 ng mL⁻¹, für Hev b 3 62 ng mL⁻¹, für Hev b 5 14 ng mL⁻¹ und für Hev b 6.02 140 ng mL⁻¹. Für künstlichen Schweiß betrugen die Referenzkonzentrationen für Hev b 1 239 ng mL⁻¹, für Hev b 3 78 ng mL⁻¹, für Hev b 5 18 ng mL⁻¹ und für Hev b 6.02 134 ng mL⁻¹.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 32: Angabe der freigesetzten Konzentration $c(\text{frei})$ und der Freisetzung in Prozent der freigesetzten Allergenmenge mit nachträglicher Zugabe des Calciumcarbonats (Freisetzung).

Probe	SK-1			
Extraktionsmittel	Bidest. Wasser		Künstl. Schweiß	
	$c(\text{frei})$ / ng mL ⁻¹	Freisetzung / %	$c(\text{frei})$ / ng mL ⁻¹	Freisetzung / %
Hev b 1	197	89	121	51
Hev b 3	32	55	44	46
Hev b 5	12	65	12	84
Hev b 6.02	30	21	33	24

Die Allergene werden in unterschiedlichem Ausmaß aus den Latex-Werkstücken freigesetzt. Dabei sind die Ergebnisse unabhängig von der Wahl des Extraktionsmittels. In Abbildung 53 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Zum besseren Vergleich sind neben den so erhaltenen Ergebnissen auch noch die Ergebnisse für die Darstellungsmethode gezeigt, bei der die Probe SK-1 mit dem Polymer Dispex® N40 dispergiert und vor der 24-stündigen Reifung zum *Dipping Compound* hinzu gegeben wurde.

4. Ergebnisse und Diskussion

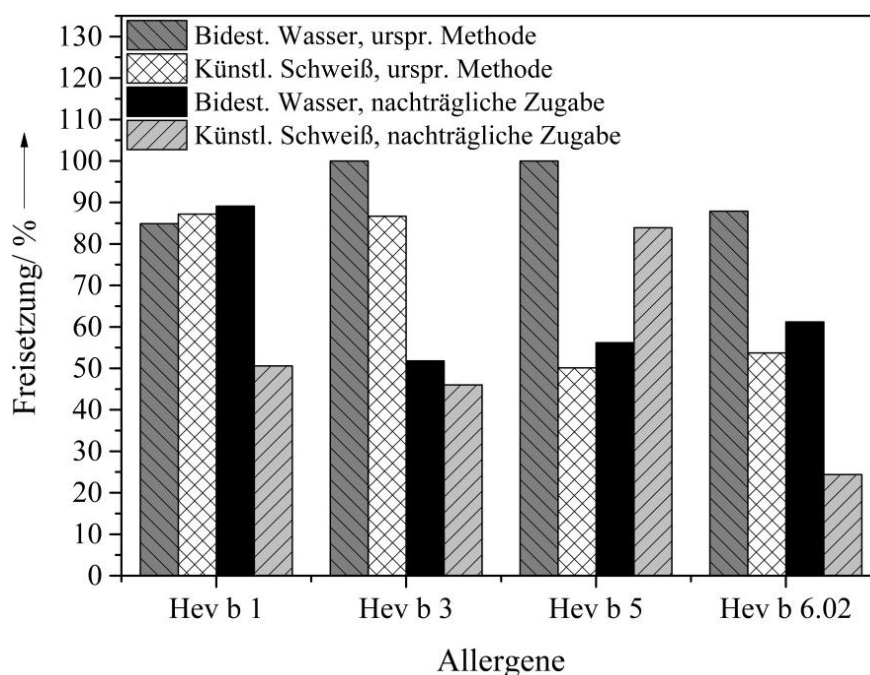


Abbildung 53: Grafische Darstellung der prozentualen Freisetzung der Allergene bei Darstellung der Werkstücke mit der Probe SK-1 durch Zugabe der Probe nach Reifung der Dispersion für die verwendeten Extraktionsmittel (schwarz: bidest. Wasser, hellgrau: künstlicher Schweiß) im Vergleich zu der prozentualen Freisetzung mit der ursprünglichen Methode (dunkelgrau: bidest. Wasser, weiß: künstlicher Schweiß).

Die Freisetzung einiger Allergene konnte durch Variation des Zugabezeitpunkts des Calciumcarbonats deutlich herabgesetzt werden. Die Darstellungsmethode scheint einen besonderen Einfluss auf die Allergene Hev b 3 und Hev b 6.02 zu haben. Gerade die Herabsetzung der freigesetzten Konzentration von Hev b 6.02 ist von großem Vorteil und Interesse, da dieses Allergen das größte allergene Potential besitzt. Auch die anderen freigesetzten Allergenkonzentrationen werden zum größten Teil erniedrigt. Lediglich bei dem Allergen Hev b 1 unter Verwendung von bidestilliertem Wasser und bei Hev b 5 unter Verwendung von künstlichem Schweiß ist die prozentuale Freisetzung ähnlich wie bei der ursprünglichen Methode. Die Freisetzung der anderen Allergene wird somit stark erniedrigt, so dass die nachträgliche Zugabe des Calciumcarbonats eine Herabsetzung der Freisetzung der Allergene zur Folge hat und der Einfluss des Dispergierungsmittels nachgewiesen werden konnte.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Extraktionsmethode und somit die Freisetzungskinetik untersucht. Die Fragestellung war, welchen Einfluss das Zerschneiden der Werkstücke und die starke mechanische Beanspruchung während der

4. Ergebnisse und Diskussion

Extraktion auf den Allergengehalt haben. Die Freisetzung der Allergene erfolgte mit nicht zerschnittenen Werkstücken, welche bei 80 U min^{-1} statt 250 U min^{-1} auf einem Kreisschüttler für 5 h geschüttelt wurden. Dieses wurde mit der Calciumcarbonatphase SK-1 und, um den Referenzwert zu ermitteln, mit Werkstücken ohne Calciumcarbonatzusatz getestet. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 33 gezeigt. Die Referenzkonzentrationen betrugen für bidestilliertes Wasser als Extraktionsmittel für Hev b 1 181 ng mL^{-1} , für Hev b 3 68 ng mL^{-1} , für Hev b 5 15 ng mL^{-1} und für Hev b 6.02 65 ng mL^{-1} . Für künstlichen Schweiß sind die Referenzkonzentrationen für Hev b 1 228 ng mL^{-1} , für Hev b 3 100 ng mL^{-1} , für Hev b 5 15 ng mL^{-1} und für Hev b 6.02 77 ng mL^{-1} .

Tabelle 33: Angabe der freigesetzten Konzentration $c(\text{frei})$ und der Desorption in Prozent (Freisetzung) der freigesetzten Allergenmenge bei milder mechanischer Beanspruchung und ohne Zerschneiden der Werkstücke.

Probe	SK-1			
Extraktionsmittel	Bidest. Wasser		Künstl. Schweiß	
	$c(\text{frei})$ / ng mL^{-1}	Freisetzung / %	$c(\text{frei})$ / ng mL^{-1}	Freisetzung / %
Hev b 1	134	74	178	78
Hev b 3	42	61	55	55
Hev b 5	12	82	11	76
Hev b 6.02	18	27	19	24

In Tabelle 33 ist deutlich zu erkennen, dass die verschiedenen Allergene unterschiedlich stark freigesetzt werden. Es ist kein Einfluss des Extraktionsmittels zu erkennen. In der nachfolgenden Abbildung 54 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Zum besseren Vergleich der Ergebnisse mit denen, die bei der ursprünglichen Extraktionsmethode bei Verwendung der Probe SK-1 erzielt wurden, sind die prozentualen Freisetzungen der ursprünglichen Methode ebenfalls abgebildet.

4. Ergebnisse und Diskussion

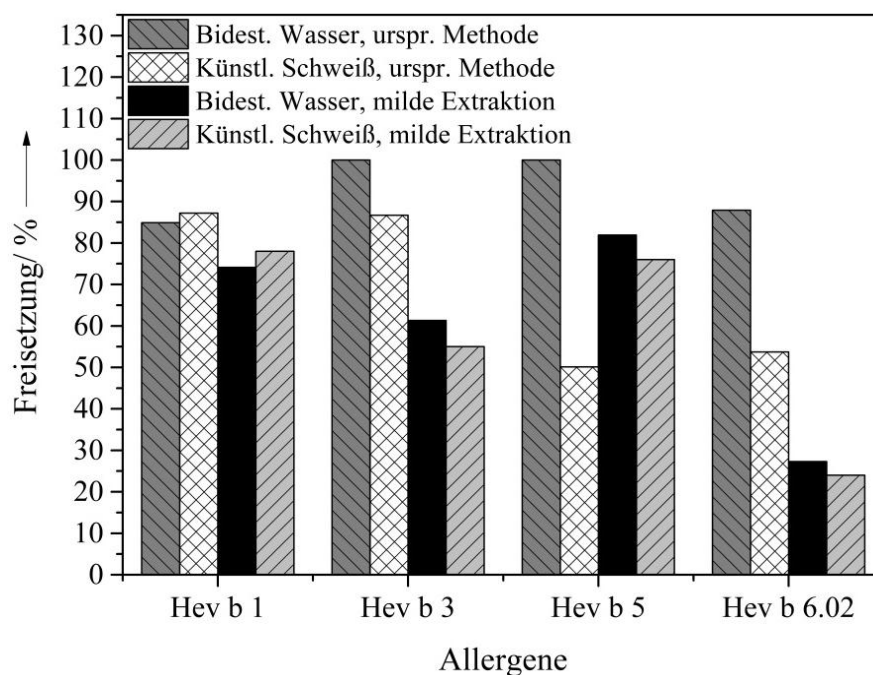


Abbildung 54: Grafische Darstellung der prozentualen Freisetzung der Allergene bei Darstellung der Werkstücke mit der Probe SK-1 durch Variation der Extraktionsmethode für die verwendeten Extraktionsmittel (schwarz: bidest. Wasser, hellgrau: künstlicher Schweiß) im Vergleich zu der prozentualen Freisetzung mit der ursprünglichen Methode (dunkelgrau: bidest. Wasser, weiß: künstlicher Schweiß).

Die prozentuale Freisetzung der Allergene wird durch Variation der Extraktionsparameter deutlich herabgesetzt. Erneut ist die Herabsetzung der freigesetzten Allergenkonzentration des allergensten Proteins Hev b 6.02 wieder sehr deutlich. Aber auch die Freisetzung der weiteren Allergene wird deutlich vermindert. Eine Ausnahme bildet hier nur das Allergen Hev b 5. Es lässt sich somit festhalten, dass neben dem Zugabezeitpunkt der Calciumcarbonate auch die Wahl der Extraktionsmethode und der gewählten Parameter einen deutlichen Einfluss auf die desorbierten Allergenkonzentrationen hat.

4.1.8 Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit wurden die polymorphen Calciumcarbonate und ACC phasenrein hergestellt und charakterisiert. Zudem wurden lösungskalorimetrische Messungen an den polymorphen Calciumcarbonaten und ACC durchgeführt. Die Adsorption der allergenen Naturlatex-Proteine Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02

4. Ergebnisse und Diskussion

konnte an den selbst synthetisierten polymorphen Calciumcarbonaten, sowie an denen, die vom Kooperationspartner SCHAEFER KALK zur Verfügung gestellt und komplett charakterisiert wurden, realisiert werden. Zudem wurden die Desorption der Allergene von den Feststoffen und die Freisetzung der Allergene aus selbst gefertigten Latex-Werkstücken untersucht.

Die lösungskalorimetrischen Messungen lieferten für die polymorphen Calciumcarbonate Calcit, Aragonit und Vaterit die erwarteten Ergebnisse, welche sich mit der Literatur vergleichen ließen. Dahingegen entsprachen die Ergebnisse der lösungskalorimetrischen Messungen von ACC nicht den Literaturwerten und konnten mit der Instabilität von ACC und dem variierenden Wassergehalt von ACC, je nach Bestimmungsmethode, in Zusammenhang gebracht werden.

Die Adsorption der Allergene an die verschiedenen Calciumcarbonate konnte mit bidestilliertem Wasser als Lösungsmittel realisiert werden. Die Abhängigkeit des Lösungsmittels wurde durch Verwendung von PBS untersucht und war signifikant. Der Einfluss der Temperatur während der Adsorptionsuntersuchungen hingegen war zu vernachlässigen. Der Einfluss der Ausgangskonzentration wurde durch Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der Allergene untersucht. Für das Allergen Hev b 3 ließ sich eine Abhängigkeit der Adsorption von der Ausgangskonzentration erkennen. Bei geringen Ausgangskonzentrationen adsorbierte das Allergen schlechter an die verwendeten Substrate. Ferner konnte keine Abhängigkeit der Adsorption von der Morphologie, der Polymorphie oder der spezifischen Oberfläche der Calciumcarbonate festgestellt werden. Lediglich die Probe SK-6, bei der es sich um Calcit/Vaterit-Plättchen handelte, zeigte vermindertes Adsorptionsvermögen. In Abbildung 55 sind die Ergebnisse der Adsorption der Allergene an die Calciumcarbonat-Phasen zusammenfassend dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

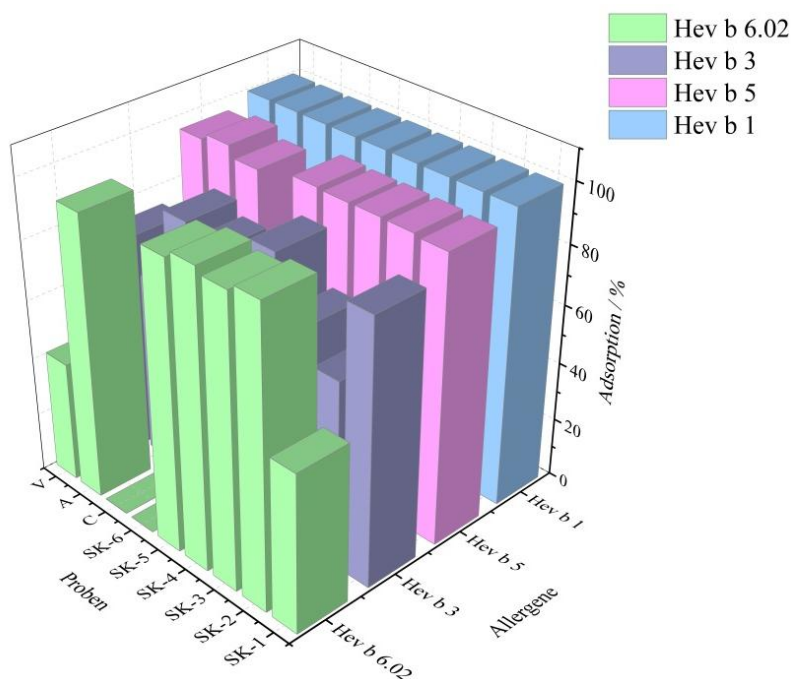


Abbildung 55: Zusammenfassung der Adsorptionsergebnisse für bidestilliertes Wasser als Extraktionsmittel, $T=RT$ und die jeweils höchsten Ausgangskonzentrationen.

Der Einfluss der Adsorptionsversuche auf die verwendeten Calciumcarbonate wurde ebenfalls untersucht. So konnte festgestellt werden, dass die Adsorption auf die Proben vom Kooperationspartner SCHAEFER KALK keinen Einfluss hatte, während dies bei den selbst synthetisierten Calciumcarbonaten zu beobachten war. Mittels REM-Aufnahmen war bei dem zuvor phasenreinen Aragonit neben den charakteristischen Nadeln auch rhomboedrische Strukturen von Calcit zu erkennen. Dies konnte mittels Röntgenbeugung belegt werden. Bei Vaterit war mittels Rasterlektronenmikroskopie die charakteristische sphärische Morphologie zu erkennen. Mittels Röntgenbeugung wurde allerdings festgestellt, dass beim zuvor phasenreinen Vaterit durch den Einfluss der Adsorption eine Phasenumwandlung stattgefundenen hatte. Lediglich ein einzelner Reflex konnte noch Vaterit zugeordnet werden.

Die Desorption der Allergene von den verwendeten Calciumcarbonaten wurde ebenfalls untersucht. So konnte festgestellt werden, dass die Allergene Hev b 1 und Hev b 3 zu ungefähr 50 % von den Oberflächen desorbierten, während die Allergene Hev b 5 und Hev b 6.02 nur sehr gering desorbierten. Eine Temperaturabhängigkeit, Lösungsmittelabhängigkeit oder eine Abhängigkeit der Morphologie und Polymorphie konnte auch bei der Desorption der Allergene nicht festgestellt werden.

Des Weiteren konnten Naturlatex-Werkstücke hergestellt werden, welche die

4. Ergebnisse und Diskussion

verschiedenen Calciumcarbonate mit in das Latex-Netzwerk der Werkstücke eingebaut hatten. Ziel war es, die Freisetzung der Allergene aus den Werkstücken durch Adsorption an die Calciumcarbonate zu hemmen. In Abbildung 56 sind die Ergebnisse der Allergenfreisetzung für die verwendeten Calciumcarbonate gezeigt.

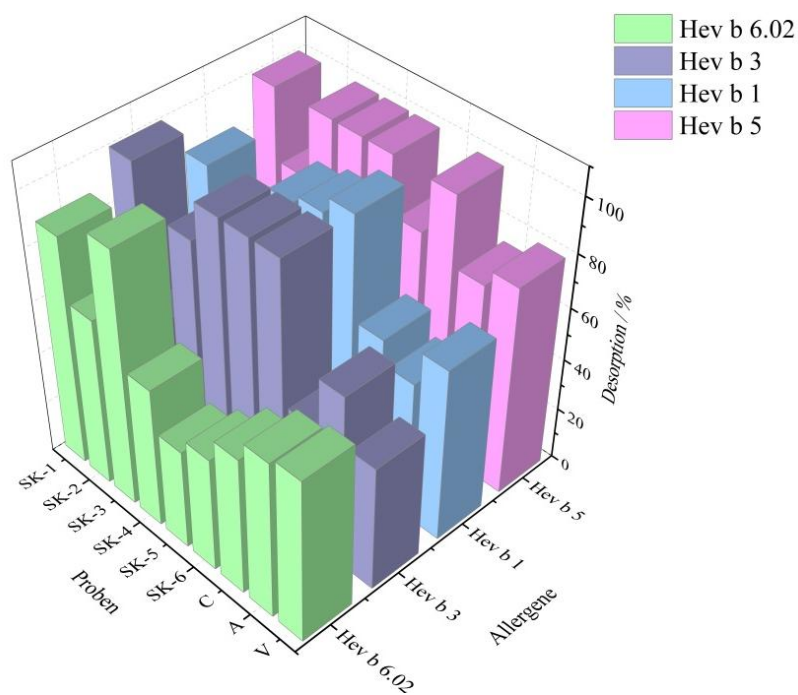


Abbildung 56: Zusammenfassung der Freisetzungssergebnisse aus den selbst dargestellten Werkstücken ($T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$, bidest. Wasser).

Die Freisetzung der Allergene konnte trotz Einbau der verschiedenen Calciumcarbonate teilweise vermindert werden. Die Allergene wurden in unterschiedlichem Ausmaß freigesetzt. Allerdings konnte eine Abhängigkeit der Freisetzung bezüglich der Verwendung des Dispergierungsmittels Dispex[®] N40 beobachtet werden. Dieses ist das Natriumsalz der Polyacrylsäure, ein negativ geladenes Polymer, welches die Calciumcarbonate dispergieren und somit auch stabilisieren soll. Durch die Adsorption von Dispex an die Oberfläche der Calciumcarbonate war diese nicht mehr zugänglich für die Allergene, so dass keine oder nur eine geringe Adsorption der Allergene statt finden konnte. Dieser Einfluss wurde durch die Variation des Zugabezeitpunkts der Calciumcarbonate untersucht. Die Freisetzung der Allergene konnte durch die Variation der Darstellungsmethode der Latex-Werkstücke deutlich herabgesetzt werden.

Ein ähnlicher Zusammenhang konnte bezüglich der Freisetzungskinetik und dem mechanischen Anspruch an die Werkstücke erkannt werden. Bei Freisetzungsversuchen, bei denen die Werkstücke nicht zerschnitten und mit geringerer mechanischer Belastung

4. Ergebnisse und Diskussion

freigesetzt wurden, konnte die Freisetzung der Allergene ebenfalls deutlich herabgesetzt werden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 57 zusammenfassend dargestellt.

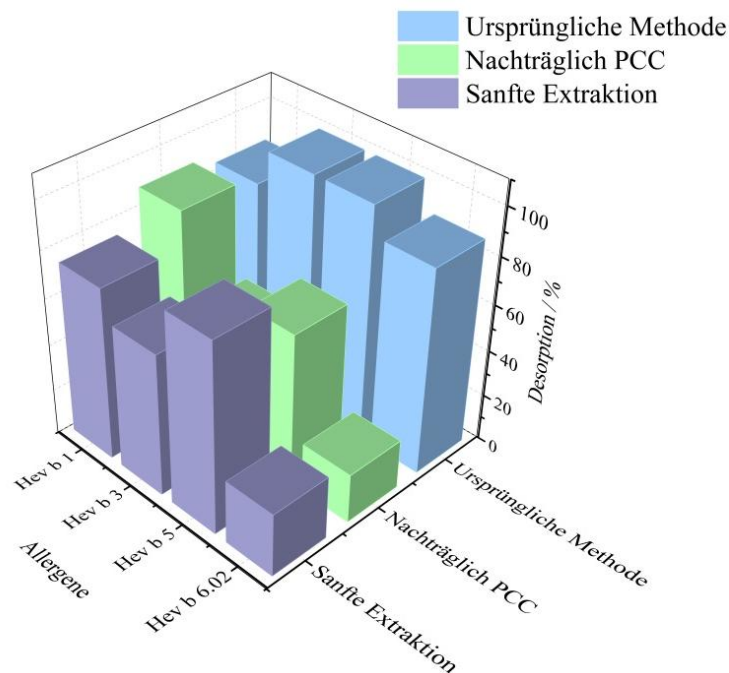


Abbildung 57: Zusammenfassung des Einflusses vom Zugabezeitpunkt des Calciumcarbonats und der Extraktionsmethode im Vergleich zur ursprünglich durchgeführten Desorption der Allergene.

Der Einfluss des Zugabezeitpunkts und der mechanischen Beanspruchung ist deutlich zu erkennen. Gerade die Freisetzung von Hev b 6.02, welches die größte allergene Wirkung besitzt, konnte durch Variation der Methoden deutlich herabgesetzt werden.

Somit ist die Adsorption der Latex-Allergene an Calciumcarbonate möglich. Die Reduzierung der Allergene aus sogenannten *dipped products* ist allerdings aufgrund der Vielzahl der Faktoren, welche die freigesetzte Allergenkonzentration beeinflussen, schwieriger zu realisieren.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.2 Darstellung, Charakterisierung und zellbiologische Untersuchung von Calciumcarbonat-Nanopartikeln

4.2.1 Einführung in die Thematik

Wie schon in den theoretischen Grundlagen erwähnt wurde, sind Nanopartikel aufgrund des großen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen und den damit verbundenen Veränderungen in den chemischen und physikalischen Eigenschaften in der Forschung von bedeutsamem Interesse. Genetisch bedingte Krankheiten können durch Einbringen von Biomolekülen behandelt werden.^[139, 140] Durch Einbringen von solchen Biomolekülen wie DNA oder siRNA (engl. *small interfering RNA*) in die Zellen kann die Synthese des kodierten Proteins entweder angeschaltet (DNA) oder abgeschaltet (siRNA) werden.^[141, 142] Ohne ein geeignetes Trägersystem sind Nukleinsäuren allerdings nicht in der Lage, die Membran einer Zelle zu durchdringen, so dass Methoden entwickelt wurden, um aktive Biomoleküle in die Zelle einzubringen und vor dem Abbau durch Nukleasen zu schützen. Dabei unterscheidet man virale Methoden und nicht-virale Methoden.^[143, 144]

Bei der viralen Methode handelt es sich um die Infektion von Zellen mit Viren. Dies wird als Transduktion bezeichnet und liefert hohe Transfektionseffizienten, ist aber gleichzeitig mit starken Nebenwirkungen verbunden.^[145] Bei den nicht-viralen Techniken unterscheidet man physikalische und chemische Methoden. Die physikalischen Methoden beinhalten *gene-gun*-Techniken, Mikroinjektionen und Elektroporation.^[146–148]

Die chemische Methode geht auf die Verwendung von Nukleinsäure-beladenen Nanopartikeln oder anderen kationischen Substanzen, wie z. B. Polymeren und Lipiden, zurück. Mit kationischen Substanzen, unter anderem dem Polymer Polyethylenimin, bilden sich aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren sogenannte Polyplexe aus, welche aufgrund der positiven Oberflächenladung in der Lage sind, die negativ geladene Zellmembran zu durchdringen und somit gute Transfektionseffizienzen zu zeigen.^[149–151] Ähnlich ist dies bei der Anwendung von Lipiden.^[152, 153] Nachteil an der Verwendung von kationischen Substanzen ist die oftmals toxische Wirkung auf die Zellen.^[154]

Durch Beladung von anorganischen Nanopartikeln mit Nukleinsäuren kann der toxische Effekt umgangen werden. So sind Calciumphosphat-Nanopartikel aufgrund der sehr guten Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit zur Transfektion von Zellen geeignet.^[143, 151, 155] Des Weiteren ist die Verwendung von Silica, Gold, Magnetit und

4. Ergebnisse und Diskussion

weiteren Erdalkalimetallphosphaten bekannt.^[150, 156, 157] Die Aufnahme der Nanopartikel in die Zelle geschieht dabei über Endozytose, welche in drei Teilschritten abläuft. Zunächst bildet sich aus dem Nanopartikel und der Zellmembran ein Vesikel aus, welches im Anschluss endosomal in die Zelle aufgenommen wird. Nach Freisetzung des Partikels in das Zytoplasma kann dort der Abbau der DNA durch Nukleasen erfolgen, so dass ein geeigneter Schutz der DNA durch das Trägersystem erfolgen muss. Ist dies gewährleistet, so kann die DNA in den Zellkern gelangen und dort die Bildung der mRNA (engl. *messenger* RNA) anregen. Gelangt diese ins Zytoplasma, so wird die Bildung des kodierten Proteins angeregt (Translation).^[158, 159]

Die Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel konnte dabei in der Arbeitsgruppe EPPL auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. So konnten die Synthesen sowohl kontinuierlich als auch halbkontinuierlich realisiert werden.^[160, 161]

Daher sollte die Darstellung von Nukleinsäure-stabilisierten Calciumcarbonat-Nanopartikeln mittels eines halbkontinuierlichen Fällungsverfahrens erfolgen. Des Weiteren sollten Transfektionsuntersuchungen und Bestimmungen der Zellvitalität mittels MTT-Test durchgeführt werden. Die Umladung der mit DNA-funktionalisierten Nanopartikel zur Änderung der Oberflächenladung erfolgte mittels Polyethylenimin.

In der Literatur sind funktionalisierte Calciumcarbonate nur wenig beschrieben. So gibt es die Möglichkeit zur Anwendung von nano-Calciumcarbonat zum Transport von hydrophilen Wirkstoffen und bioaktiven Proteinen. Diese Nanopartikel wurden durch den verwendeten Wirkstoff, der zum Teil auch an die Oberfläche der Partikel adsorbiert war, stabilisiert.^[162] Ferner findet man die Darstellung von Calciumcarbonat-Nanopartikeln durch ein Polymer-vermitteltes Wachstum.^[163] Dabei wird Polyethylenglykol mit dem entsprechenden Calciumsalz versetzt und nach Komplexierung mit der Carbonatlösung gemischt. Diese entstandenen Nanopartikel besitzen aufgrund der Darstellungsmethode keine definierte Struktur, sondern weisen das Polymer sowohl im Kern als auch auf der Oberfläche auf.

Die durchgeführte Syntheseroute bewirkt dahingegen die Darstellung eines anorganischen Calciumcarbonat-Kerns, auf dessen Oberfläche sich die DNA befindet.

In der Literatur sollen Calciumcarbonat-Nanopartikel keinen Einsatz in der Transfektion finden, sondern in Gummi, Plastiken oder in der Papierherstellung verwendet werden.^[163]

Eine weitere Einsatzmöglichkeit finden Calciumcarbonat-Nanopartikel als Biosensoren.^[164] Auch unfunktionalisierte Nanopartikel, die durch Einleiten von Kohlendioxid in Kalkmilch dargestellt werden konnten, zeigen ihre

4. Ergebnisse und Diskussion

Anwendungsmöglichkeit aufgrund der hohen spezifischen Oberfläche vor allem in den industriellen Bereichen (z. B. Papierherstellung).^[165] Zudem erfolgt die Darstellung von Calciumcarbonat-Nanopartikeln oftmals auch zur Untersuchung der Kristallisation von Calciumcarbonat.^[166]

4.2.2 Synthese der Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel und der mit Polyethylenimin-umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel

Die Darstellung der mit DNA funktionalisierten Calciumcarbonat-Nanopartikel erfolgte mit Hilfe einer halbkontinuierlichen Fällungsapparatur. Dazu wurden wässrige Lösungen von Calciumchlorid-Hexahydrat (20 mM) und Natriumcarbonat (20 mM) ohne weitere Einstellung des pH-Wertes hergestellt. Als Nukleinsäure wurde fragmentierte DNA (*free acid, crude oligonucleotides from herring sperm*, $c=3 \text{ mg mL}^{-1}$, $<50 \text{ bp}$) verwendet und vor Gebrauch zur Abtrennung von Verunreinigungen filtriert. Es wurden jeweils 6 mL der Lösungen mit Hilfe einer Peristaltikpumpe bei einem Volumenstrom von 27 mL min^{-1} pro Schlauch zusammengepumpt. Zur Keimbildung wurden die beiden Lösungen vor Stabilisierung mit DNA in einem Kristallisationschlauch mit der Länge von 25 mm und einem Innendurchmesser von 3 mm zusammengeführt und anschließend unter starkem Rühren in die DNA-Vorlage (5 mL) getropft (siehe schematische Darstellung in Abbildung 58). Die Verweilzeit τ betrug 0,4 s.

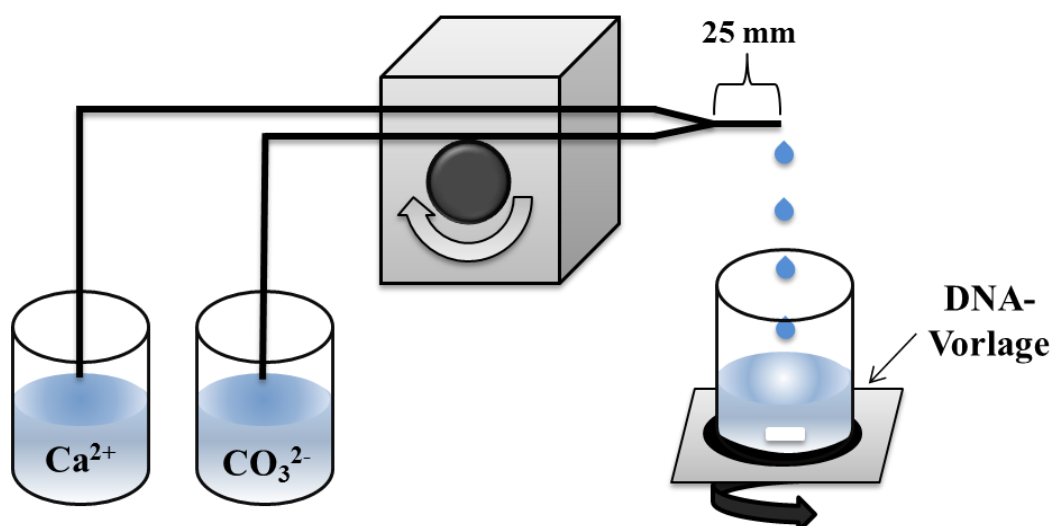


Abbildung. 58: Schematische Darstellung der halbkontinuierlichen Fällungsapparatur zur Darstellung der DNA-funktionalisierten Calciumcarbonat-Nanopartikel.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die entstandene Dispersion wurde für ca. 30 Min gerührt und anschließend einmalig mittels Ultrazentrifugation ($t=30$ Min, 66000 g) und Redispersierung in bidestilliertem Wasser aufgereinigt.

Die Darstellung der Polyethylenimin (PEI)-stabilisierten Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel erfolgte zunächst über die eben beschriebene Darstellung der DNA-funktionalisierten Calciumcarbonat-Nanopartikel. Im Anschluss daran wurde 1 mL der Partikeldispersion mit 3 mL PEI (*branched*, $c=2$ g L⁻¹, $M_w=25$ kDa) versetzt und kräftig durchmischt. In Abbildung 59 ist die Monomereinheit von PEI abgebildet.

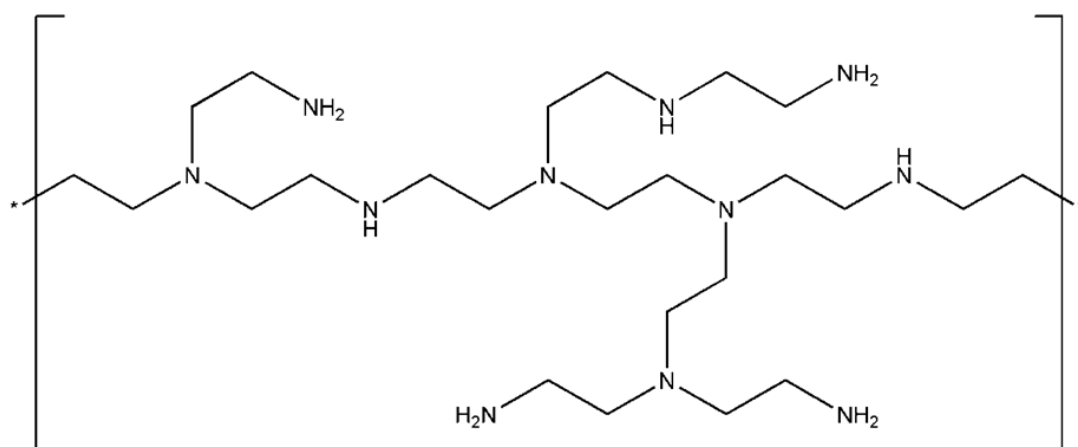


Abbildung 59: Monomereinheit des verwendeten Polyethylenimins.

Die erhaltene Dispersion ließ sich nicht aufreinigen, da die Partikel sich nach dem Abzentrifugieren nicht redispersieren ließen. Deshalb wurde die Dispersion ohne Aufreinigen für alle weiteren Arbeiten verwendet, so dass sich neben den umgeladenen Nanopartikeln auch nicht-adsorbiertes Polyethylenimin in der Nanopartikel-Dispersion befand.

4.2.3 Durchführung der zellbiologischen Untersuchungen

Die für die Transfektion und die MTT-Tests verwendeten Nanopartikel wurden analog der eben beschriebenen Synthese dargestellt. Allerdings wurde EGFP-kodierende DNA (*enhanced green fluorescent protein*, EGFP) verwendet. Diese bewirkt nach der Transfektion die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins, welches fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden kann. Die Ausgangskonzentration der EGFP-DNA betrug 9,9 mg mL⁻¹ und wurde so verdünnt, dass eine 3 mg mL⁻¹ Lösung

4. Ergebnisse und Diskussion

hergestellt wurde. Die weitere Darstellung der Nanopartikel erfolgte wie in Absatz 4.2.2 beschrieben.

Für die Transfektion mit EGFP-kodierender DNA wurden HeLa-Zellen (Henrietta Lacks, humane Epithelzellen eines Gebärmutterhalskarzinoms) verwendet. Diese wurden bei $T=37\text{ °C}$ und unter 5%iger Kohlendioxid-Atmosphäre in DMEM (mit 10 % fötalem Kälberserum (engl. *fetal calf serum*; FCS) sowie Penicillin und Streptomycin) kultiviert. 12 h vor den Experimenten wurden die Zellen trypsinisiert und in eine 24-well-Multititerplatte mit einer Zelldichte von 25000 Zellen pro *well* ausgesät und zur Adhäsion der Zellen an die *well*-Oberflächen bei $T=37\text{ °C}$ und unter 5%iger Kohlendioxid-Atmosphäre gelagert. Für die Transfektion wurden die Zellen anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Nanopartikel versetzt. Nach 7 h erfolgte ein Austausch des Mediums. Die Transfektionseffizienz wurde nach 72 h mittels Lichtbild- und Fluoreszenzaufnahmen detektiert. Die entsprechende prozentuale Transfektionseffizienz wurde aus dem Quotienten der Anzahl der fluoreszierenden Zellen und der Gesamtzahl der Zellen gebildet.

Der MTT-Test der transfizierten Zellen erfolgte nach 72 h. Dazu wurde MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in PBS ($c=5\text{ mg mL}^{-1}$) gelöst und mit Zellkulturmedium verdünnt ($c=1\text{ mg mL}^{-1}$). Anschließend wurde das Zellkulturmedium der transfizierten Zellen abgesaugt und durch 300 μL der MTT-Lösung ausgetauscht. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei $T=37\text{ °C}$ unter 5%iger Kohlendioxid-Atmosphäre. Die MTT-Lösung wurde anschließend entfernt und nach Zugabe von 300 μL DMSO (Dimethylsulfoxid) und 30 minutiger Inkubation wurden 100 μL der Lösung zur photometrischen Detektion bei einer Wellenlänge von 570 nm entnommen. Die Zellvitalität wurde mit Hilfe der Absorption der transfizierten Zellen bezogen auf die Absorption der Kontrolle berechnet.

Die zellbiologischen Untersuchungen wurden mit Hilfe von Herrn M. Sc. Gregor Dördelmann durchgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.2.4 Charakterisierung der Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel und der mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel

Die mit DNA funktionalisierten Calciumcarbonat-Nanopartikel wurden ca. 1 h nach der Darstellung zunächst mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) auf ihre Größenverteilung und ihr Zetapotential hin untersucht. In Abbildung 60 sind die Größenverteilung (**A**) und das Zetapotential (**B**) für die unaufgereinigten (schwarz) und aufgereinigten (grün) Nanopartikel gezeigt.

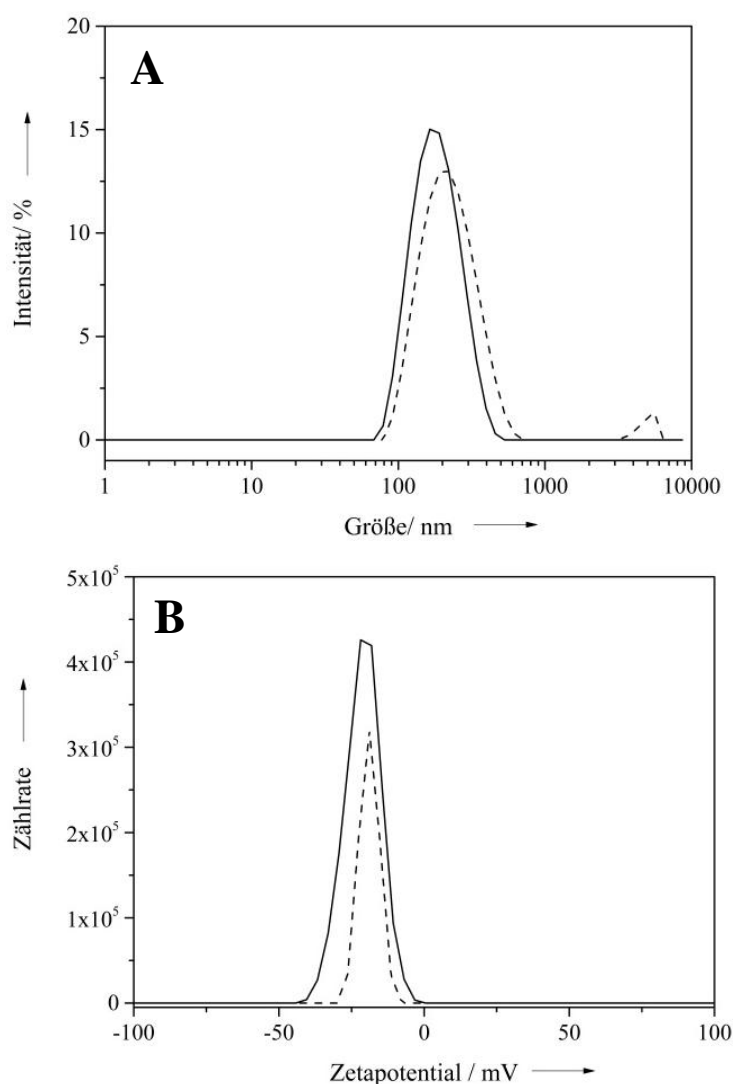


Abbildung 60: Größenbestimmung (**A**) und Zetapotential-Messung (**B**) für die nicht-aufgereinigten (schwarz) und aufgereinigten (schwarz gestrichelt) Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die mittlere Größe, also der *z-Average*, der nicht aufgereinigten Nanopartikel beträgt 170 nm. Die Breite der Verteilung liegt zwischen 68 und 458 nm. Nach dem Aufreinigen ist eine leichte Verbreiterung der Verteilung zu erkennen. Die Größe der Partikel beträgt nun 208 nm, und die Verteilung liegt zwischen 75 und 600 nm. Zudem ist die Bildung von Agglomeraten ersichtlich. Der Polydispersitätsindex (PDI) liegt für die nicht-aufgereinigten Partikel bei 0,128, was für eine monodisperse Verteilung spricht, wohingegen die aufgereinigten Partikel einen PDI von 0,223 aufweisen. Das Zetapotential liegt für die nicht-aufgereinigten Partikel bei -21 ± 6 mV. Nach der Aufreinigung liegt das Zetapotential bei -19 ± 3 mV. Der negative Wert des Zetapotentials ist auf die Adsorption der anionischen DNA an die Nanopartikel zurückzuführen. Normalerweise sind Partikel mit einem Zetapotential von ± 30 mV über längere Zeit stabil. Trotz des relativ geringen Zetapotentials zeigte sich allerdings, dass die nicht-aufgereinigten Nanopartikel einige Tage lang stabil vorlagen und durch Schütteln redispergiert werden konnten.

Die mittlere Größe und das Zetapotential der mit PEI umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel wurden ebenfalls bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 61 dargestellt.

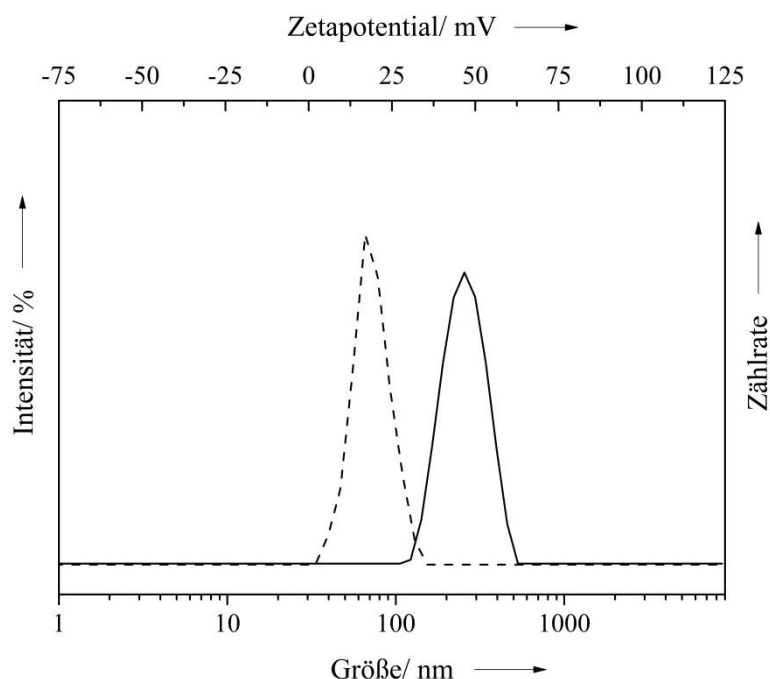


Abbildung 61: Größenbestimmung (schwarz) und Zetapotential-Messung (schwarz gestrichelt) für die nicht-aufgereinigten, mittels PEI umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die mittlere Größe der Partikel beträgt 352 nm. Somit sind die Partikel, die umgeladen wurden, deutlich größer als die Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel, was auf die Vergrößerung des hydrodynamischen Radius aufgrund der Adsorption von Polyethylenimin an die Oberfläche zurückzuführen ist. Die Breite der Verteilung liegt zwischen 120 nm und 480 nm. Der PDI spricht mit 0,341 eher für ein polydisperses System. Das Zetapotential beträgt 19 ± 6 mV und verdeutlicht, dass die Umladung der Partikel gelungen ist. Durch die Anlagerung von PEI an die Oberfläche der Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel wird eine positive Oberflächenladung erhalten.

Die Größe des anorganischen Kerns wurde mittels REM bestimmt. Die REM-Aufnahmen für die Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel für die nicht-aufgereinigten (**A**) und aufgereinigten (**B**) Nanopartikel sind in Abbildung 62 gezeigt.

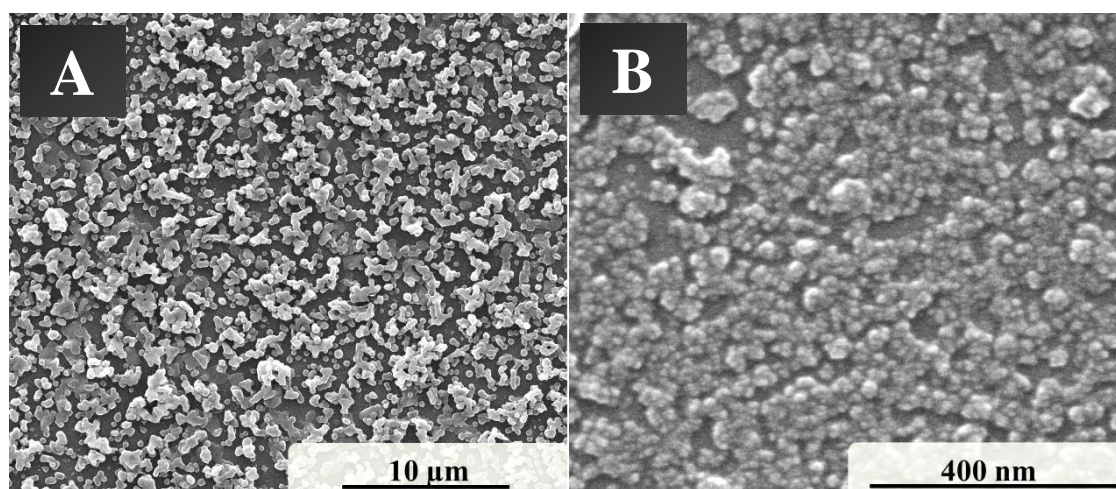


Abbildung 62: REM-Aufnahmen der nicht aufgereinigten (**A**) und einmalig aufgereinigten (**B**) Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel.

Die mittlere Größe der Partikel, die mittels REM-Aufnahmen bestimmt wurde, liegt bei den nicht-aufgereinigten Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikeln zwischen 100 und 130 nm. Die aufgereinigten Nanopartikel zeigen in den REM-Aufnahmen agglomerierte Strukturen mit einer etwas breiteren Verteilung in ihrer Kerngröße. Diese beläuft sich im Mittel auf 120–180 nm. Die mit PEI umgeladenen Nanopartikel ließen sich nicht aufreinigen. In Abbildung 63 sind REM-Aufnahmen der mit PEI umgeladenen Nanopartikel gezeigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

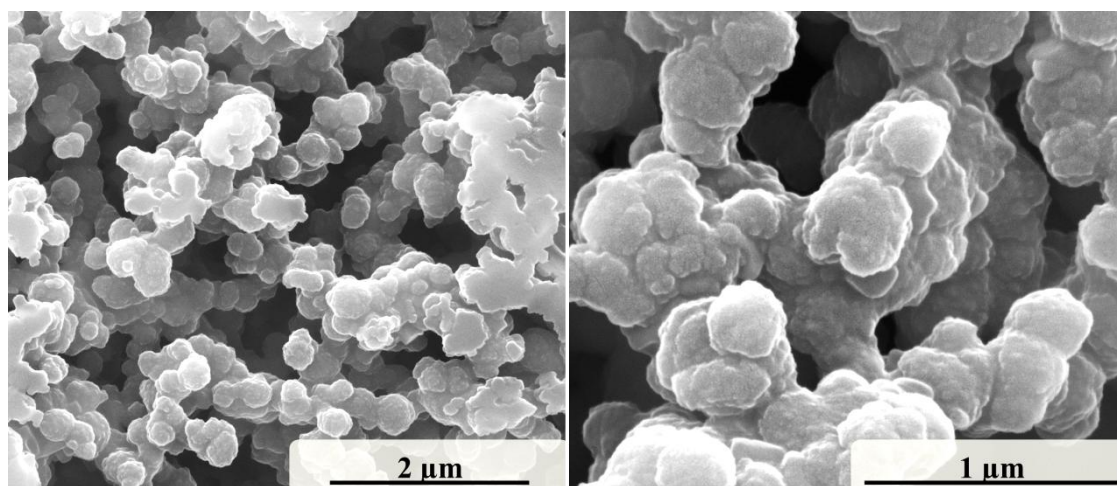


Abbildung 63: REM-Aufnahmen der mit PEI umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel.

Die mit PEI-umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel zeigen stark agglomerierte Strukturen. Die durchschnittliche Größe der nicht-aufgereinigten, umgeladenen Partikel beläuft sich auf 200 bis 450 nm.

In Abbildung 64 ist das Röntgendiffraktogramm der mit DNA-funktionalisierten Nanopartikel (schwarz) und der mit PEI-umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel (grün) abgebildet. Aufgrund der geringen Größe der Partikel ist eine Reflexverbreiterung zu erkennen. Ein Vergleich mit den Literaturreflexen von Vaterit (ICDD 01-072-0506) zeigt, dass sowohl im Fall der Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel als auch im Fall der mit PEI umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel Vaterit-Nanopartikel dargestellt wurden. Im Gegensatz zu den DNA-funktionalisierten Nanopartikeln ist bei den mit PEI umgeladenen Nanopartikeln der kristalline Anteil der Probe noch geringer und der amorphe Charakter noch deutlicher ausgeprägt.

4. Ergebnisse und Diskussion

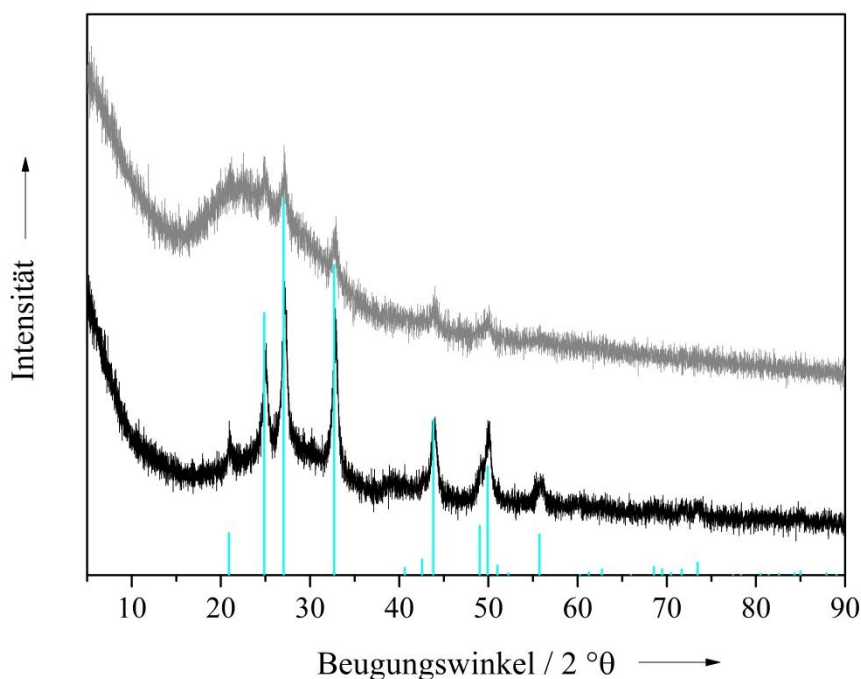


Abbildung 64: XRD der DNA-funktionalisierten Calciumcarbonat-Nanopartikel (schwarz) und der mit PEI-umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel (grau). Die hellblauen Linien sind die eingezeichneten Literaturreflexe von Vaterit mit der Referenz 01-072-0506 (ICDD).

Das IR-Spektrum in Abbildung 65 entspricht den Erwartungen. Bei den Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikeln sind neben den charakteristischen OH-Banden die Schwingungsbanden der C-O-Bindungen des Calciumcarbonats zu erkennen. Bei den mit PEI-umgeladenen Nanopartikeln erkennt man zudem noch Schwingungsbanden, welche den Amino-Gruppen im Polyethylenimin zugeordnet werden können.

4. Ergebnisse und Diskussion

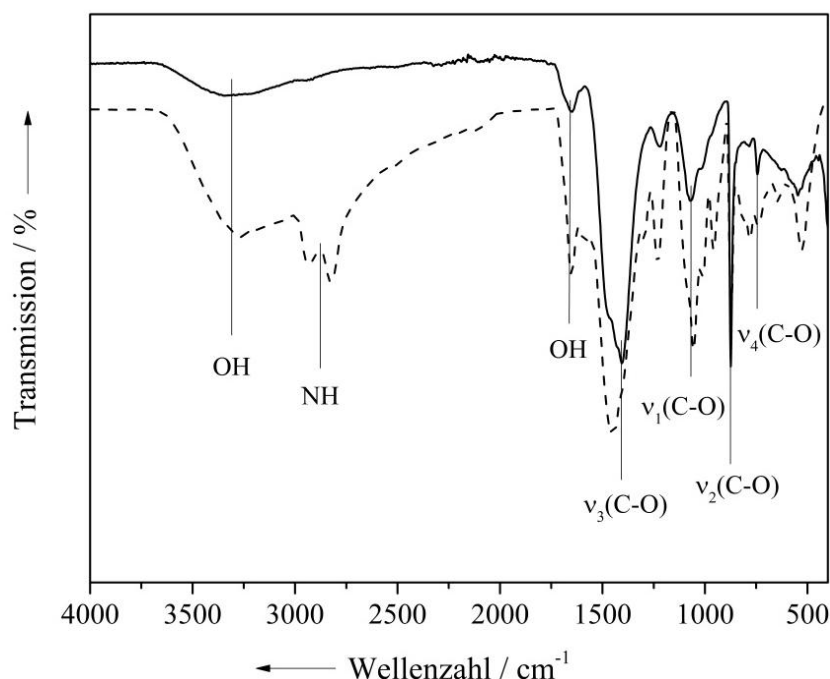


Abbildung 65: IR der mit DNA-funktionalisierten (schwarz) und der mit PEI-umgeladenen (schwarz gestrichelt) Calciumcarbonat-Nanopartikel mit eingezeichneten Schwingungsbanden.

Die Thermogravimetrische Analyse zeigt einen Massenverlust, der sowohl für die Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel (oben) als auch für die mit PEI-umgeladenen Nanopartikel (unten) in drei definierten Stufen stattfindet (Abbildung 66). Die erste Stufe beschreibt den Wasserverlust der Probe und beläuft sich auf 2,1 %. Die zweite Zersetzungsstufe umfasst mit 20,1 % den Abbrand der DNA und die dritte Stufe beschreibt den Kohlendioxidverlust des Calciumcarbonats, welcher aufgrund der adsorbierten DNA deutlich geringer ist als bei einer reinen Calciumcarbonatprobe. Der berechnete Calciumcarbonatanteil der Probe beläuft sich anhand der TG auf 59,7 %. Die erste Zersetzungsstufe der mit PEI-umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel beschreibt den Wasserverlust der Probe und beträgt 5,8 %. Die zweite Stufe umfasst den Abbrand an DNA und PEI und beläuft sich auf 67,8 %. Der Massenverlust aufgrund des Kohlendioxidverlustes ist in der dritten Stufe zu erkennen und ist mit 6,8 % deutlich geringer als der theoretisch erwartete Wert einer reinen Calciumcarbonat-Probe. Der gesamte Calciumcarbonatanteil berechnet aus dem Kohlendioxidverlust der mit PEI-umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel beträgt somit 15,4 %.

4. Ergebnisse und Diskussion

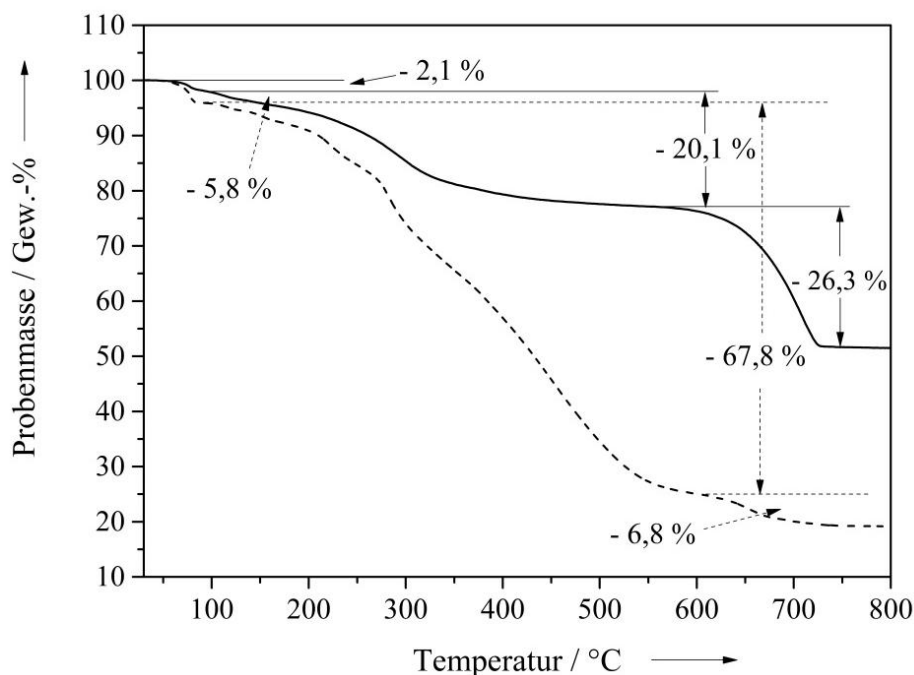


Abbildung 66: TG-Kurven der mit DNA funktionalisierten Calciumcarbonat-Nanopartikel (schwarz) und der mit PEI-umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel (schwarz gestrichelt). Die Messungen erfolgten von 30 °C bis 1200 °C unter Sauerstoffatmosphäre bei einer Heizrate von 2 K min⁻¹.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse und Atomabsorptionsspektroskopie sind in Tabelle 34 gezeigt. Über den gemessenen Stickstoffanteil lässt sich der DNA-Gehalt der für die Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel berechnen. Dieser beläuft sich laut EA auf $19,8 \pm 0,9$ % und stimmt somit mit dem mittels TG bestimmten Wert überein. Den Wassergehalt kann man über den Wert für Wasserstoff berechnen, nachdem der Wasserstoffanteil der DNA abgezogen wurde, so dass für den Wasseranteil noch $0,71 \pm 0,04$ Gew.-% Wasser verbleiben. Somit ergibt sich laut EA ein berechneter Wasseranteil von $6,3 \pm 0,4$ %, welcher deutlich höher ist als der mittels TG bestimmte Wert. Der Anteil an Calcium liegt deutlich unter dem theoretisch für CaCO_3 erwarteten Wert von 40,04 Gew.-%. Dies lässt sich mit der Anwesenheit der DNA erklären. Der gesamte Calciumcarbonatanteil lässt sich anhand der EA über den gemessenen Calciumgehalt berechnen und beläuft sich laut EA auf $72,4 \pm 1,6$ %. Somit ist der Calciumcarbonatanteil, der mittels EA bestimmt wurde, deutlich höher als der mittels TG bestimmte Wert. Der gesamte, mittels EA bestimmte Anteil an Calciumcarbonat, DNA und Wasser beträgt somit $98,5 \pm 2,9$ %.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 34: Daten der EA und AAS für die Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel.

CaCO_3	Ca gefunden / %	C gefunden / %	O berechnet / %	H gefunden / %	N gefunden / %
CaCO_3 -DNA-NP	29,0±0,6	15,4±0,1	51,5±0,3	1,6±0,1	2,6±0,1
CaCO_3 -DNA- PEI-NP	6,5±0,4	40,2±0,2	27,4±1,0	7,1±0,2	19,1±0,5
Theoretisch CaCO_3	40,04	12,00	47,95	0,00	0,00

Für die mittels PEI umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel folgt, dass der Anteil an Calcium sehr deutlich unter dem theoretisch erwarteten Wert von 40,04 Gew.-%. liegt. Dies lässt sich mit der Anwesenheit großer Mengen an DNA und PEI erklären. Der gesamte Calciumcarbonatanteil lässt über den gemessenen Calciumgehalt berechnen und beläuft sich laut EA auf 16,2±1,1 %. Der Kohlenstoffanteil der mineralischen Phase ist somit 1,9±0,1 %. Somit lassen sich 38,3±0,1 Gew.-% des Kohlenstoffs der DNA und dem PEI zuordnen. Da sowohl DNA als auch PEI die Elemente Wasserstoff, Stickstoff und Kohlenstoff beinhalten, ist eine Aufschlüsselung der Anteile an PEI und DNA nicht möglich. Somit ist der Calciumcarbonatanteil, der mittels EA bestimmt wurde, fast identisch mit dem mittels TG bestimmten Wert.

Die DNA-Konzentration der Partikel wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie quantifiziert, Dazu wurden die Partikel quantitativ abzentrifugiert und der Überstand mittels UV/Vis-Spektrometer vermessen. Durch eine Kalibriergerade, für die bekannte Konzentrationen an DNA mittels UV/Vis vermessen wurden, und der dazugehörigen Geradengleichung, konnte so die unbekannte DNA-Konzentration bestimmt werden. In Abbildung 67 ist die Kalibriergerade dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

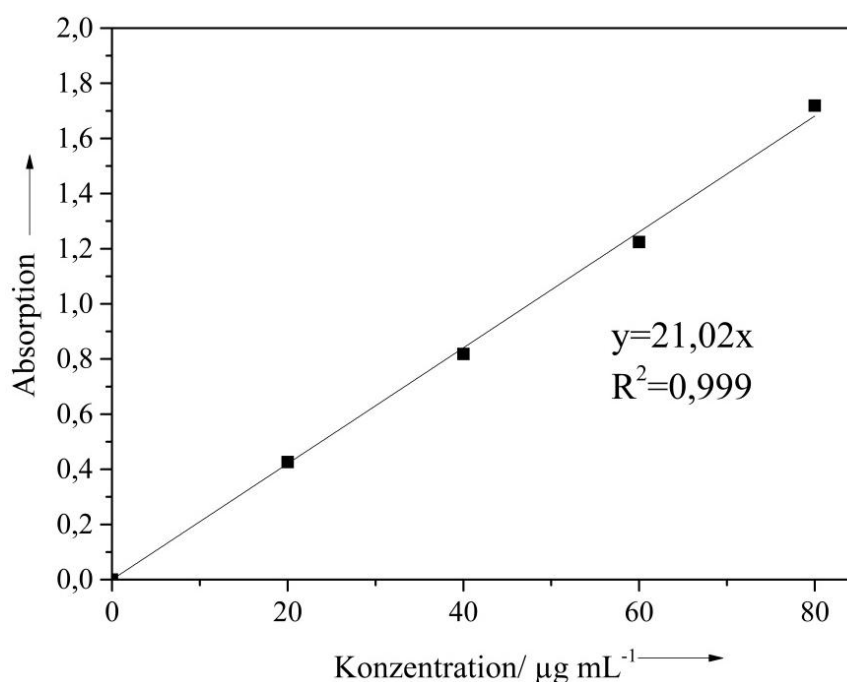


Abbildung 67: Kalibriergerade definierter Konzentrationen an DNA (<50 bp) mit Angabe der Geradengleichung und des Korrelationskoeffizienten.

Zur Messung der DNA-Konzentration der Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel wurde der Überstand verdünnt. Dazu wurde ein Volumen von 5 μL vom Überstand auf 2 mL aufgefüllt. Die gemessene Absorption bei einer Wellenlänge von 261 nm betrug 0,121, so dass bei einer verwendeten Konzentration von 3 mg mL^{-1} folgt, dass 698 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DNA an den Partikeln adsorbiert sind. Dies entspricht 240 μg DNA pro Milligramm Calciumcarbonat-Nanopartikel. Dies entspricht 24 Gew.-% und stimmt im Rahmen des Fehlers sehr gut mit dem mittels Thermogravimetrie bestimmten Wert von 20,1 Gew.-% überein.

In der nachfolgenden Tabelle 35 sind die Ergebnisse für die Zusammensetzung der Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel und der mit PEI-umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel tabellarisch zusammengefasst.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 35: Zusammenfassung der Zusammensetzungen der Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel und der mit PEI-umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel (TG= mittel Thermogravimetrie bestimmt, EA= mittels Elementaranalyse bestimmt, UV= mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt).

CaCO₃	CaCO₃ / Gew.-%	H₂O / Gew.-%	DNA / Gew.-%	DNA+PEI / Gew.-%	CO₂ / Gew.-%
CaCO ₃ -DNA-NP	59,7 (TG) 72,4 (EA)	2,1 (TG) 0,7 (EA)	20,1 (TG) 19,8 (EA) 24 (UV)	-	26,3 (TG)
CaCO ₃ -DNA- PEI-NP	15,4 (TG) 16,2 (EA)	5,8 (TG)	-	67,8 (TG)	6,8 (TG)

4.2.5 Zellbiologische Untersuchungen der Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel und der mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumcarbonat-Nanopartikel

Die in Absatz 4.2.4 charakterisierten Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel und mit PEI umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel wurden zur Durchführungen von Transfektionsexperimenten verwendet. Um die Transfektionseffizienzen für unterschiedliche Konzentrationen bestimmen zu können, wurde EGFP-DNA verwendet. Nach erfolgreicher Transfektion der Zellen führt die Verwendung von EGFP-DNA zu einer grünen Fluoreszenz. Die mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmte DNA-Konzentration betrug 0,70 mg pro mL Nanopartikel-Dispersion. Da zur Umladung von 1 Milliliter Partikeldispersion 3 mL PEI verwendet wurden und sich diese nicht aufreinigen ließen, besaßen die mit PEI umgeladenen Partikel eine gesamte PEI-Konzentration von 1,5 mg pro mL Dispersion, Für die Transfektion und den MTT-Test wurden jeweils 20 µL, 30 µL und 40 µL beider Nanopartikel-Dispersionen verwendet. Dies entspricht für die Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel zugegebenen DNA-Mengen von jeweils 14 µg, 21 µg und 28 µg. Für die mit PEI-umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel entspricht das DNA-Mengen von 4 µg, 5 µg und 7 µg bzw. PEI-Mengen von 30 µg, 45 µg und 60 µg.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Konzentration der Nanopartikel im Zellkulturmedium wurde dabei über die Ausbeute und die elementaranalytischen Daten bestimmt. Für die Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel ergibt sich aus der Elementaranalyse, dass der anorganische Kern 72,4 Gew.-% ausmacht. Mit der Ausbeute erhält man so die Masse an Calciumcarbonat pro mL Dispersion bzw. umgerechnet in SI-Einheiten in kg pro m³. Das Volumen V_{NP} der Nanopartikel berechnet man durch Annahme, dass es sich bei den Nanopartikeln um eine Kugel handelt und mit dem durchschnittlichen Radius r , so dass für die Nanopartikel mit einem Radius von 60 nm folgt:

$$V_{NP} = \frac{4}{3} \pi r^3 = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{60}{10^9} \text{ m} \right)^3 = 9,047 \cdot 10^{-22} \text{ m}^3 \quad \text{Gleichung 11}$$

Die Masse m_{NP} eines Nanopartikels berechnet sich mit Hilfe der Dichte (in kg pro m³) von Calciumcarbonat:

$$\begin{aligned} m_{NP} &= V \cdot \rho = 9,047 \cdot 10^{-22} \text{ m}^3 \cdot 2710 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \\ &= 2,45 \cdot 10^{-18} \text{ kg} \end{aligned} \quad \text{Gleichung 12}$$

Um die Partikelanzahl zu erhalten, bildet man den Quotienten der Ausbeute $m(\text{CaCO}_3)$ und der Masse m_{NP} eines Nanopartikels:

$$\begin{aligned} N_{NP} &= \frac{m(\text{CaCO}_3)}{m_{NP}} = \frac{2,27 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}}{2,45 \cdot 10^{-18} \text{ kg}} \\ &= 9,263 \cdot 10^{17} \frac{1}{\text{m}^3} = 9,263 \cdot 10^{11} \frac{1}{\text{mL}} \end{aligned} \quad \text{Gleichung 13}$$

Die Partikelanzahl der Nanopartikel im Medium berechnet man im letzten Schritt mit dem jeweils verwendeten Volumen der Nanopartikeldispersion (z. B. 20 µL) und des Volumens an Medium (0,5 mL).

In Abbildung 68 sind die lichtmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach der Transfektion mit Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikeln und mit PEI-umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikeln zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

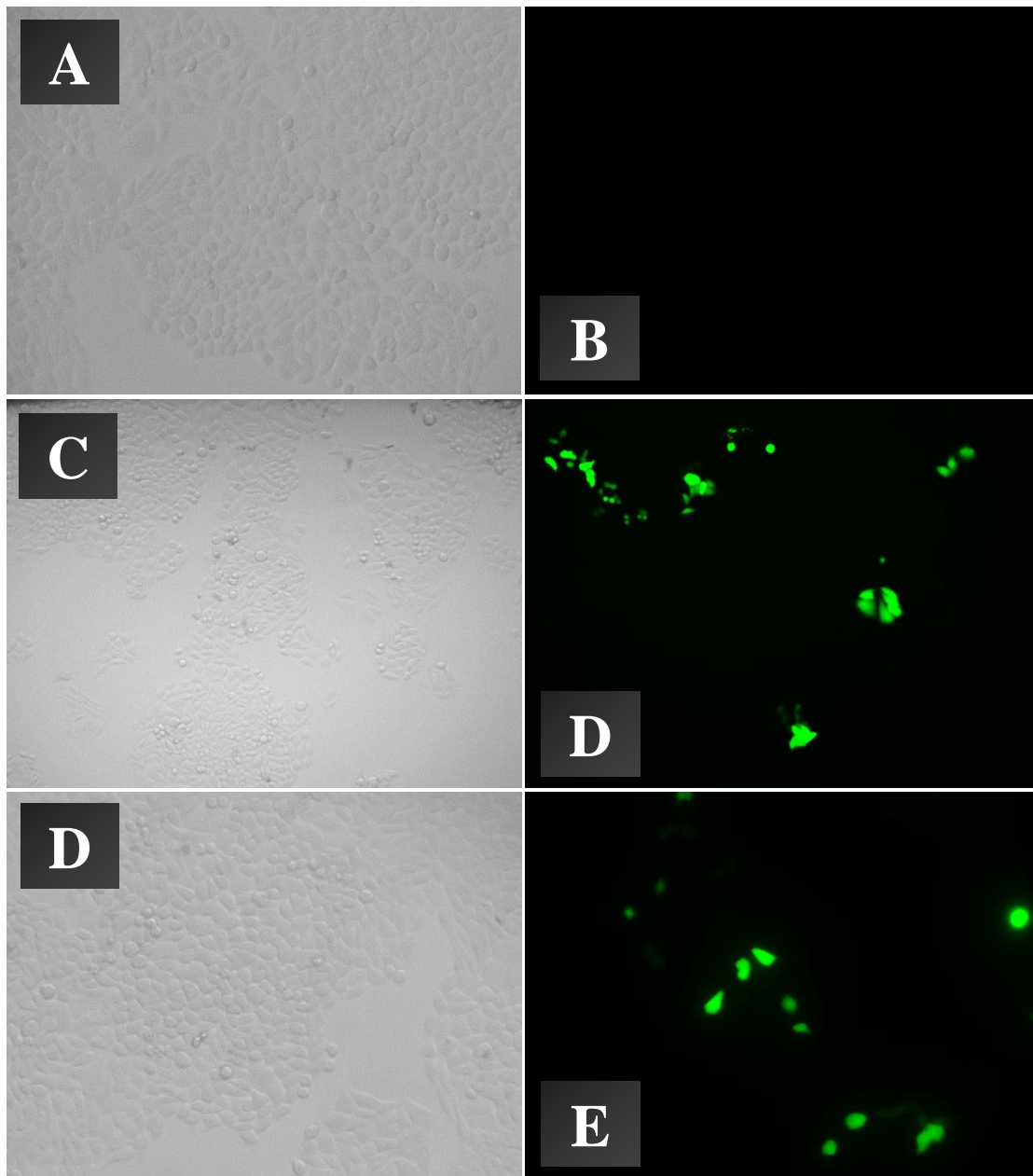


Abbildung 68: Lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HeLa-Zellen nach der Transfektion mit Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikeln (**A** und **B**, $N=5,56 \cdot 10^{10} \text{ mL}^{-1}$) und mit zwei Konzentrationen an PEI umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikeln (**C** und **D**; $N=1,25 \cdot 10^{10} \text{ mL}^{-1}$, **E** und **F**, $N=1,66 \cdot 10^{10} \text{ mL}^{-1}$).

Anhand Abbildung 68 wird ersichtlich, dass die Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel keinerlei Transfektion bewirken, wohingegen die mit PEI-beladenen Calciumcarbonat-Nanopartikel für unterschiedliche Konzentrationen Transfektion der HeLa-Zellen

4. Ergebnisse und Diskussion

aufweisen. Die quantitative Auswertung der Transfektionseffizienzen ist in Abbildung 69 zu sehen.

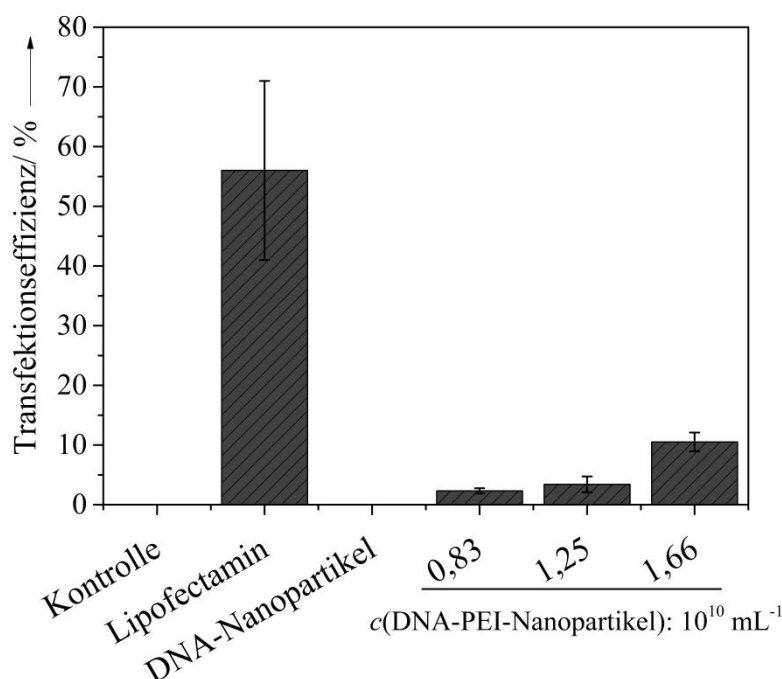


Abbildung 69: Transfektionseffizienzen der unterschiedlichen Partikelsysteme für die verschiedenen Konzentrationen. Die EGFP-DNA-funktionalisierten Calciumcarbonat-Nanopartikel, die nicht mit PEI umgeladen wurden, zeigen keine Transfektion und wurden deshalb zusammengefasst dargestellt. Die Effizienzen der PEI-beladenen EGFP-DNA-Calciumcarbonat-Nanopartikel sind für alle drei untersuchten Konzentrationen gezeigt. Zudem ist die Transfektionseffizienz von Lipofectamin gezeigt.

Es wird ersichtlich, dass die Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel, die nicht umgeladen wurden, für alle Konzentrationen keine Transfektion der Zellen bewirken. Dieser Effekt ist in Abbildung 69 unter dem Punkt „DNA-Nanopartikel“ zusammengefasst und kann unter anderem mit der negativen Oberflächenladung der Partikel erklärt werden. Die DNA-funktionalisierten Nanopartikel besitzen ein negatives Zetapotential, während die Lipiddoppelschicht der Zellmembran ebenfalls negativ geladen ist. Dies hemmt die endozytotische Aufnahme der Nanopartikel aufgrund von abstoßenden Wechselwirkungen. Wären die abstoßenden Wechselwirkungen allerdings die einzige Begründung zur nicht erfolgten Transfektion der Zellen, so dürften andere, bekannte Partikelsysteme, die ebenfalls positive Oberflächenladungen besitzen (z. B. Calciumphosphat-DNA-Nanopartikel) auch keine Transfektion bewirken. Deshalb können die Beobachtungen nicht allein mit der Oberflächenladung der Calciumcarbonat-

4. Ergebnisse und Diskussion

DNA-Nanopartikel erklärt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre z. B. der Abbau der DNA im Zytoplasma durch Nukleasen. Die mit PEI-beladenen Nanopartikel weisen im Gegensatz zu den Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikeln abhängig von der Konzentration Transfektionseffizienzen zwischen $2\pm 0,5\%$ und $11\pm 2\%$ auf. Im Vergleich dazu zeigt kommerziell erhältliches Lipofectamin Transfektionseffizienzen von $56\pm 14\%$.

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden MTT-Tests durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 70 gezeigt.

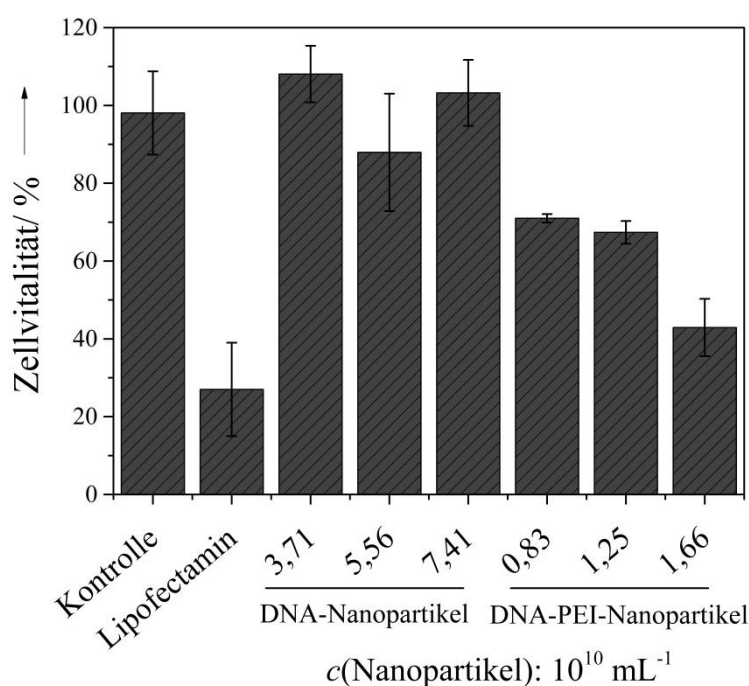


Abbildung 70: Ergebnisse für die Zellvitalität bei Verwendung von Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikeln und PEI umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikeln. Neben der Zellvitalität der Kontrolle ist die Zellvitalität bei Verwendung von Lipofectamin angegeben.

Die Zellvitalität bei Verwendung der Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel ist im Rahmen des Fehlers für alle verwendeten Konzentrationen annähernd 100 %. Dahingegen nimmt die Zellvitalität bei Verwendung der mit PEI umgeladenen Nanopartikel konzentrationsabhängig ab. Bei maximaler Konzentration an PEI beträgt die Zellvitalität nur noch $43\pm 8\%$. Bei Lipofectamin, welches sehr hohe Transfektionseffizienzen lieferte, liegt die Zellvitalität nur noch bei $27\pm 12\%$.

Schon WELZEL *et al.* konnten zeigen, dass die Verwendung von Calciumphosphat-DNA-Nanopartikeln, die in einem diskontinuierlichen Prozess dargestellt wurden, zu

4. Ergebnisse und Diskussion

Transfektionseffizienzen von ungefähr 1 % führte. Bei Verwendung von serumfreien Zellmedium, also ohne Proteine, war die Transfektionseffizienz gesteigert (ca. 5 %).^[23] SOKOLOVA *et al.* konnten ferner zeigen, dass halbkontinuierlich dargestellte, einschalige DNA-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel Transfektionseffizienzen zwischen 1 und 4 % lieferten.^[157] Dahingegen führte die Verwendung von Calciumphosphat-Nanostäbchen, welche mit DNA beladen wurden, lediglich zu Transfektionseffizienzen von 1 bis 2 %.^[142] Mit den dargestellten Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikeln konnte aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen und trotz Verwendung unterschiedlicher DNA-Konzentrationen keine Transfektion der Zellen nachgewiesen werden. Des Weiteren ist bekannt, dass das Umladen mit Polyethylenimin zu einer Steigerung der Transfektionseffizienz führt, Polyethylenimin allerdings auch zytotoxisch ist.^[167, 168] Während die Zellvitalität für die Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel bei annähernd 100 % liegt, nimmt die Vitalität der Zellen bei Verwendung der mit Polyethylenimin umgeladenen Nanopartikel mit steigender Konzentration ab. Dieser Effekt ist bekannt und konnte auch schon bei anderen Partikelsystemen beobachtet werden.^[168] Die maximale Transfektionseffizienz von 11 ± 2 % ist vergleichbar mit den mehrschaligen Nanopartikeln nach SOKOLOVA *et al.*, welche auf der äußersten Schale eine Beladung mit Polyethylenimin besitzen.^[168]

4.2.6 Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit konnte die Darstellung von Calciumcarbonat-Nanopartikeln mittels einer halbkontinuierlichen Fällungsapparatur realisiert werden. Zur Stabilisierung wurde fragmentierte Modell-DNA verwendet (<50 bp). Die verwendeten Calcium- und Carbonatlösungen wurden dabei zur Keimbildung und Kristallisation des Calciumcarbonats mittels eines Schlauchreaktors zusammengeführt und anschließend unter Rühren in die DNA-Vorlage getropft. Nach Aufreinigung der Partikel konnten diese mit Hilfe des Polymers Polyethylenimin umgeladen werden. Die so entstandenen Partikel wurden kolloidchemisch charakterisiert. Der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel lag laut Dynamischer Lichtstreuung für die Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel bei 170 nm und für die mit PEI umgeladenen Nanopartikel bei 352 nm. Die Kerngröße der Partikel wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie bestimmt und lag für die DNA-Nanopartikel zwischen 100 und 130 nm und für die mit PEI umgeladenen

4. Ergebnisse und Diskussion

Nanopartikel zwischen 200 und 450 nm. Die Oberflächenladung der Partikel wurde durch Messung des Zetapotentials bestimmt. Dieses betrug für die anionischen Calciumcarbonat-Nanopartikel -21 ± 6 mV und für die mit PEI-beladenen Nanopartikel 19 ± 6 mV. Die Calciumcarbonat-Phase der Partikel wurde mittels Röntgenbeugung bestimmt. Bei beiden Proben handelte es sich um Vaterit. Die Zusammensetzung der Partikel wurde zum einen thermogravimetrisch und zum anderen mittels Elementaranalyse und Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Es zeigte sich, dass der mineralische Anteil der mit PEI umgeladenen Nanopartikel sehr gering war. Der mittels Thermogravimetrie bestimmte Calciumcarbonatanteil betrug 15,4 Gew.-% und der mittels Elementaranalyse bestimmte Anteil 16,2 Gew.-%. Über den Anteil an Stickstoff ließ sich die DNA-Menge an der Oberfläche der Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel berechnen. Dieser betrug 19,8 Gew.-% und stimmte sehr gut mit dem mittels Thermogravimetrie bestimmten Wert von 20,1 Gew.-% überein. Die DNA-Menge an der Oberfläche der Partikel wurde ebenfalls mittels UV/Vis-Spektroskopie ermittelt. Es konnte festgestellt werden, dass 698 µg DNA pro mL Dispersion an den Partikeln verbleibt. Dies entspricht einer DNA-Menge von 24 Gew.-%.

Zur Untersuchung der biologischen Aktivität der Nanopartikel wurden des Weiteren Transfektionsexperimente an HeLa-Zellen, sowie MTT-Tests unter Verwendung von EGFP-DNA durchgeführt. Die Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel zeigten keine Transfektion der Zellen, die Zellvitalität lag für die verwendeten Konzentrationen bei annähernd 100 %. Die mittels PEI umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel zeigten konzentrationsabhängige Transfektionseffizienzen zwischen 2 ± 1 % und 11 ± 2 %. Die Zellvitalität für diese Partikel war deutlich erniedrigt und konzentrationsabhängig. Daher zeigte sich, dass der Einsatz von PEI umgeladenen Partikeln als effizientes Transfektionsmittel aufgrund der zytotoxischen Wirkung nur eingeschränkt möglich ist.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.3 Chemische Konversion von Goldalgen

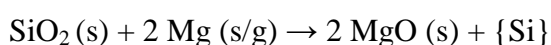
4.3.1 Einführung in die Thematik

Sind Organismen in der Lage, Mineralien auszubilden, so bezeichnet man diesen Vorgang als Biomineralisation. In der Natur gibt es Lebewesen, welche Silica-mineralisierte (Siliciumdioxid) Strukturen ausbilden. Dieser Prozess wird auch als Biosilification bezeichnet. Diese Biomineralien besitzen besondere strukturelle Charakteristika, die für jede Spezies spezifisch sind.^[169–171] So bilden z. B. Diatomeen eine poröse Silica-Frustel (Zellwand), welche komplexe und hierarchische 3 D-Strukturen ausbilden.^[172–177]

Diese porösen Biomineralien können als Templat für chemische Konversionsreaktionen dienen, z. B. das Calciumcarbonat-Skelett von Seeigeln oder die Silica-Hüllen von Diatomeen (Kieselalgen).^[172, 178, 179] 2002 wurde eine derartige Umwandlungsreaktion erstmalig beschrieben, bei der mittels eines magnesiothermischen Verfahrens Biomineralien chemisch umgewandelt wurden.^[180]

Die Konversion von Silica-mineralisierenden Biomineralien zu Silicium ist aufgrund der Ausbildung von 3-dimensionalen meso- bzw. nano-Strukturen für Anwendungen im katalytischen, biochemischen, elektronischen und thermischen Bereich von Interesse. Des Weiteren ist der Einsatz in der Telekommunikation, in der Produktion oder als Elektrode in Lithium-Batterien möglich.^[172, 173, 181, 182]

So gibt es unterschiedliche Ansätze, die von porösen Silica-mineralisierenden Biomineralien als Templat ausgehen. Unter anderem wird die Ablagerung von Gold- oder Silber-Beschichtungen auf Diatom-Zellwänden mittels thermischer Bedampfung beschrieben. Dabei erfolgt zunächst die Konversion von Silica zu Silicium und anschließend die Abscheidung der Edelmetalle in und auf den Silicium-Oberflächen mit anschließender Auflösung der Template.^[172] SANDHAGE *et al.* konnten zeigen, dass sich Diatomeen mittels Konversionsreaktionen, z. B. mit Magnesium, zu Magnesiumoxid oder mit Calcium zum Calciumoxid umwandeln lassen. Die Reaktion, die diesen Prozess beschreibt, ist in der nachstehenden Reaktionsgleichung gezeigt:^[173, 180, 183]



SANDHAGE geht davon aus, dass sich das gebildete Silicium in einer binären Mischphase aus Magnesium und Silicium, Magnesiumsilicid, befindet und sich nicht auf

4. Ergebnisse und Diskussion

den Zellwänden abscheidet, so dass die Abscheidung von Magnesiumoxid auf den Diatomeen stattfindet.^[173] Auch SHEN *et al.* gelang die chemische Umwandlung von Diatomeen mittels Magnesium.^[184] BAO *et al.* zeigten, dass die Bildung von Silicium mittels chemischer Konversion von Biomineralien und nachträglichem Auswaschen des Magnesiumoxids mittels Säure möglich ist.^[185] YAMADA *et al.* gelang es, bei hohen Temperaturen aus Magnesiumsilicid polykristallines Silicium zu gewinnen.^[186]

Die hier verwendeten Chrysophyceae, umgangssprachlich aufgrund ihrer Färbung auch Goldalgen genannt, gehören zu den Protisten und ins Unterreich der Stramenopile.^[187] Protisten sind eukaryotische, ein- bis wenigzellige Lebewesen, vor allem Algen. Als Eukaryoten werden alle Organismen zusammengefasst, die einen Zellkern besitzen. Das Gegenteil sind die Prokaryoten, zu denen unter anderem Bakterien gehören. Chrysophyceae sind photoautotroph. Das bedeutet, dass sie Licht in Energie umwandeln. Sie besitzen im Normalfall zwei Chloroplasten, welche Chlorophyll a und c ausbilden. Daneben findet man auch α - und β -Carotin. Die charakteristische goldbraune Farbe der Chrysophyceae beruht auf der Bildung des Carotinoids Zeaxanthin, einem Xantophyll, welches die grünliche Farbe des Chlorophylls maskiert. Chrysophyceae sind heterokont. Das heißt, dass sie eine lange Geißel, die sogenannte Flimmergeißel, und kürzere Geißeln ohne Flimmern besitzen, welche zur Fortbewegung dienen.^[188–193] Man findet sie vor allem in Süßwässern.^[194] Zudem bilden die Gattungen *Mallomonas* und *Synura* Kieselshuppen aus Silica aus. Diese werden im Nachfolgenden für die Umwandlungsexperimente verwendet.

4.3.2 Durchführung der Experimente

Die Goldalgen wurden in der Arbeitsgruppe BOENIGK im großen Ansatz kultiviert und von dieser zur Verfügung gestellt. Es wurden der *Synura petersenii*-Stamm WA18K-A und der *Mallomonas sp.*-Stamm WA40K-F verwendet. Alle Stämme wurden mit modifizierten WC Medium bei $T=15\text{ °C}$ und $90\text{ }\mu\text{E}$ kultiviert.^[195] Um eine ausreichend hohe Ausbeute an Biomasse für weitere Analysen zu erhalten, wurden die Stämme schrittweise zu höheren Kulturvolumina übertragen. Die Kulturen wurden zunächst auf 100 mL in einen Erlenmeyerkolben überführt. Nachdem die Stämme die stationäre Phase erreicht hatten (nach ca. zwei Wochen), wurden die Kulturen in 500 mL Erlenmeyerkolben überführt und das Volumen zunächst auf 150 mL durch Zugabe von

4. Ergebnisse und Diskussion

frischem Medium erhöht. Nach ungefähr zehn Tagen wurde das Kulturvolumen verdoppelt und nach weiteren zehn Tagen auf ein Endvolumen von 400 mL durch Zugabe von frischem Medium erhöht. Nochmals zehn Tage später wurde die Biomasse zusammengefasst und für weitere Versuche zur Verfügung gestellt. Die dichten Kulturen wurden anschließend abfiltriert und getrocknet. Die Ausbeute war abhängig von der Dichte der Biomasse und variierte stark. Somit lag die Ausbeute für *Synura petersenii* zwischen 2 und 5 mg pro Liter Kulturmedium. Die Ausbeute für *Mallomonas caudata* war signifikant niedriger mit einem Maximum von 1 mg pro Liter Kulturmedium.

Die Konversionsexperimente der Goldalgen *Synura petersenii* und *Mallomonas caudata* wurden in einem selbst gefertigten Konversionsreaktor aus hitzebeständigem Stahl durchgeführt. In Abbildung 71 sind Fotografien des Reaktors, auch „Bombenreaktor“ genannt, vor den Konversionsversuchen und nach den Konversionsversuchen abgebildet. Der Reaktor besaß eine Länge von 18 cm zzgl. jeweils 2 cm an den Seiten zum Verschließen des Reaktors. Der Außendurchmesser betrug 7 cm, der Innendurchmesser 5 cm. Innerhalb des Rohrs befand sich eine Schiene, die an jeder Seite Schalen besaß, in die das Magnesiumpulver kam. Diese Schalen hatten die Maße 4·2·0,3 cm (L·B·H). Die Goldalgen wurden in 12 kleine Vertiefungen eingebracht, deren Durchmesser 0,2 cm und Tiefe 0,3 cm war. Der Reaktor wurde für die Experimente mit sechs ebenfalls aus hitzebeständigem Stahl bestehenden Sechskantschrauben verschlossen.

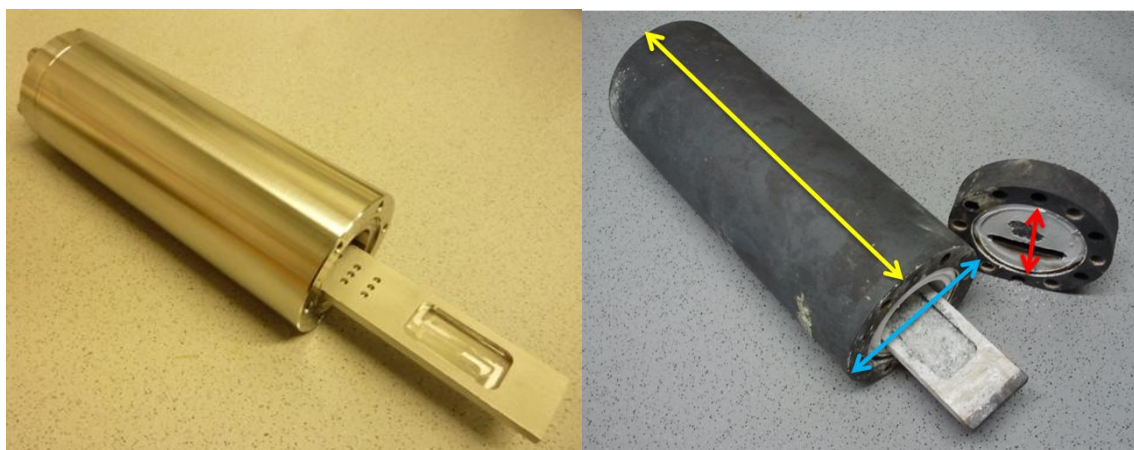


Abbildung 71: Fotografien des „Bombenreaktors“ vor (links) und nach (rechts) den Umwandlungsexperimenten.

Zur Durchführung der Konversionsexperimente wurden die getrockneten Goldalgen in die kleinen Vertiefungen eingebracht und diese maximal bis zur Hälfte gefüllt. Des Weiteren wurden 3 g Magnesiumpulver eingewogen und auf die seitlichen Schalen

4. Ergebnisse und Diskussion

verteilt. Nachdem das Bombenrohr gut verschlossen wurde, wurde es in einen Ofen überführt und einem Temperaturprogramm unterzogen. Die Aufheizphase von $T=RT$ zu $T=900\text{ °C}$ erfolgte innerhalb von 4 h, anschließend erfolgten die stationäre Phase bei $T=900\text{ °C}$ für 5 h und die Abkühlphase, welche sich 12–18 h hinzog. Im Anschluss wurde der abgekühlte Bombenreaktor geöffnet und die Goldalgen mit Hilfe einer Kanüle vorsichtig aus den Vertiefungen entfernt. Überschüssiges Magnesiumoxid, welches bei der Reaktion entstand und sich auf den Oberflächen ablagerte, wurde mittels halbkonzentrierter Salzsäure von den Goldalgen abgewaschen. Die umgewandelten Goldalgen wurden im Anschluss mittels REM und EDX charakterisiert. Aufgrund der geringen Ausbeute bei den Konversionsversuchen bzw. bei der Kultivierung von maximal und 5 mg pro Liter Kulturmedium (*Synura petersenii*) bzw. 1 mg pro Liter Kulturmedium (*Mallomonas caudata*) konnten keine weiteren Charakterisierungen nach den Umwandlungsexperimenten durchgeführt werden.

4.3.3 Ergebnisse und Diskussion

Vor den Konversionsversuchen wurden die verwendeten Goldalgen zunächst mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die REM-Aufnahmen der Goldalge *Mallomonas caudata* sind in Abbildung 72 dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

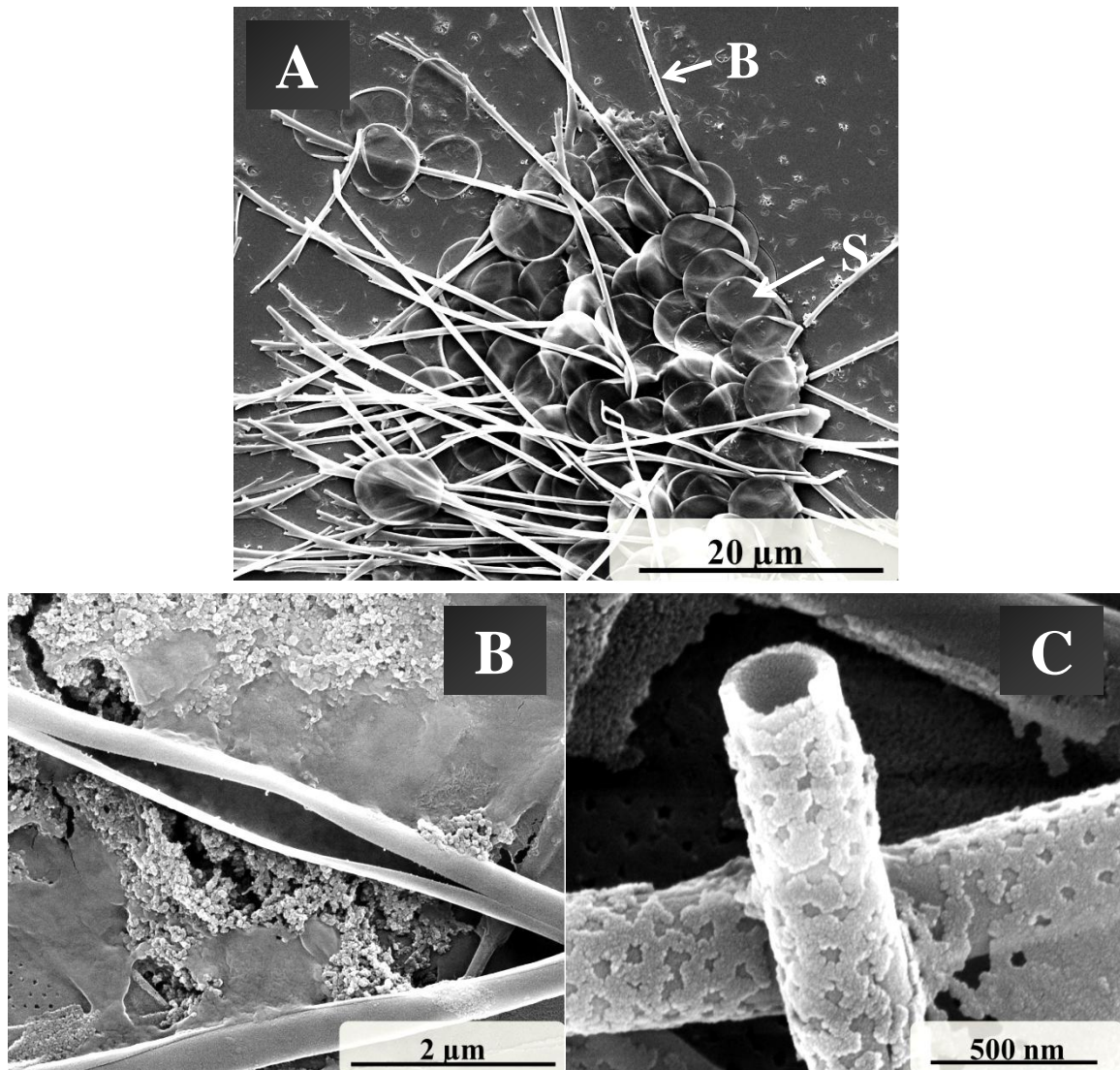


Abbildung 72: REM-Aufnahmen der Goldalge *Mallomonas caudata*. Der Durchmesser der Stacheln beträgt ca. 370 nm, die Wandstärke ca. 45 nm.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Goldalgen aus einer Art „Kopf“, dem sogenannten Schild (mit S in Abbildung 72A gekennzeichnet) und einer gezackten Borste (B in Abbildung 72A) bestehen. Diese Borsten sind hohl, ungefähr 50 µm lang, besitzen einen Durchmesser von 370 nm und eine Wandstärke von 45 nm. Ferner ist in Abbildung 72B zu erkennen, dass die Borsten eine Bruchkante besitzen, an der diese schon durch geringe mechanische Belastung bevorzugt aufbrechen. Der Schild der Goldalge besteht aus dem äußeren Ring und aus dem apikalem Porenfeld, welche sich aufgrund des Kontrastunterschiedes in den REM-Aufnahmen deutlich voneinander abheben. Der Schild besitzt einen Durchmesser von ungefähr 8 µm. In Abbildung 73 sind die REM-Aufnahmen von *Synura petersenii* dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

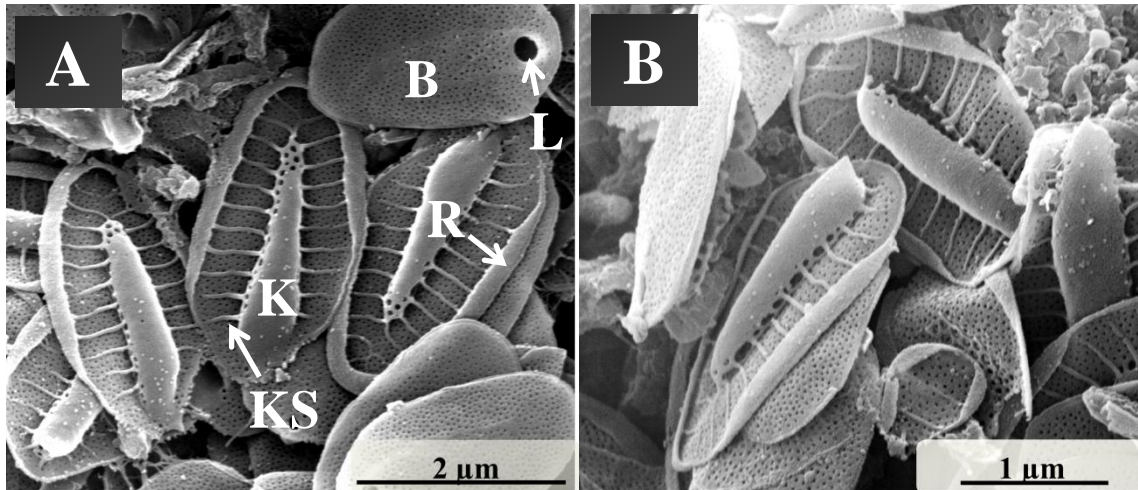


Abbildung 73: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Goldalge *Synura petersenii*.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich diese Goldalge in ihren Strukturen von *Mallomonas caudata* unterscheidet. *Synura petersenii* bildet eine Art mineralisiertes Skelett aus und besitzen eine durchschnittliche Breite von 1,5 µm und eine Länge von 3 µm. Sie sind aus der Basisfläche (mit **B** in Abbildung 73A gekennzeichnet), aus dem Rand (**R**), aus dem Keil (**K**), den Keilspitzen (**KS**) und dem Loch der Basisfläche (**L**) aufgebaut. Ähnlich wie bei *Mallomonas caudata* lässt sich auch bei *Synura petersenii* ein Porenfeld erkennen.

Da die Goldalge *Synura petersenii* bessere Ausbeuten (nahezu das Fünffache) bei der Kultivierung lieferte, konnte von dieser zusätzlich eine Thermogravimetrische Analyse durchgeführt werden. Die TG-Messung ist in Abbildung 74 zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

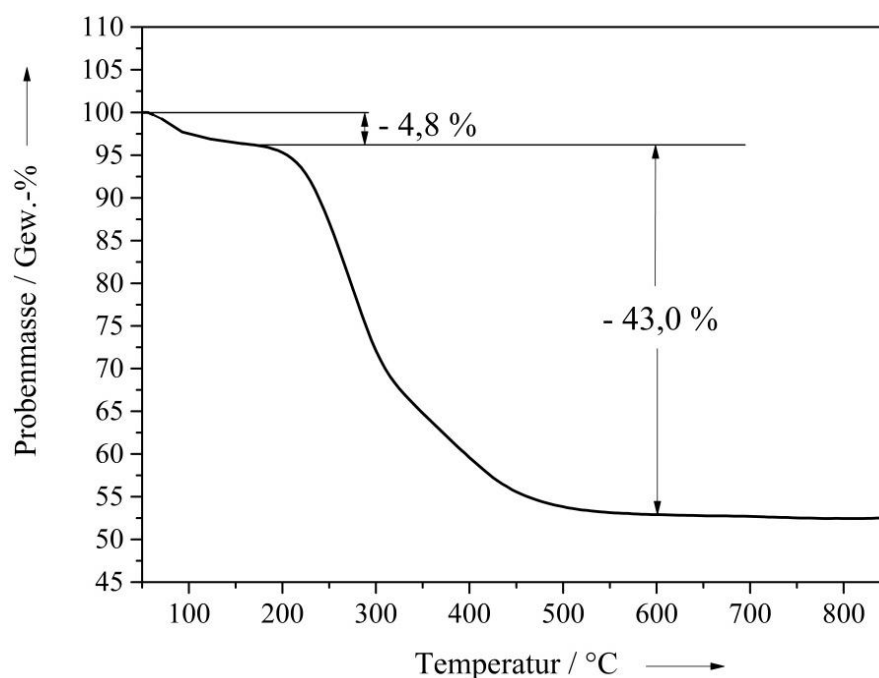


Abbildung 74: Thermogravimetrische Messung der Goldalge *Synura petersenii*. Die Messung erfolgte von 30 °C bis 1200 °C unter Sauerstoffatmosphäre bei einer Heizrate von 2 K min⁻¹.

Die erste Zersetzungsstufe zwischen 80 und 200 °C umfasst den Wasserverlust der Probe. Dieser beläuft sich auf 4,8 %. Die zweite Zersetzungsstufe ist dem Abbrand des organischen Anteils zuzuschreiben und beträgt 43,0 %. Als Rückstand verbleibt Silica, welches zu 52,2 % vorhanden sein sollte.

In Abbildung 75 sind die Röntgendiffraktogramme der Goldalgen gezeigt. Das Diffraktogramm zeigt sowohl für *Synura petersenii* (schwarz) als auch für *Mallomonas caudata* (blau) vor der Konversion keine scharfen Reflexe, was aufgrund der Anwesenheit von amorphen Silica den Erwartungen entspricht.

4. Ergebnisse und Diskussion

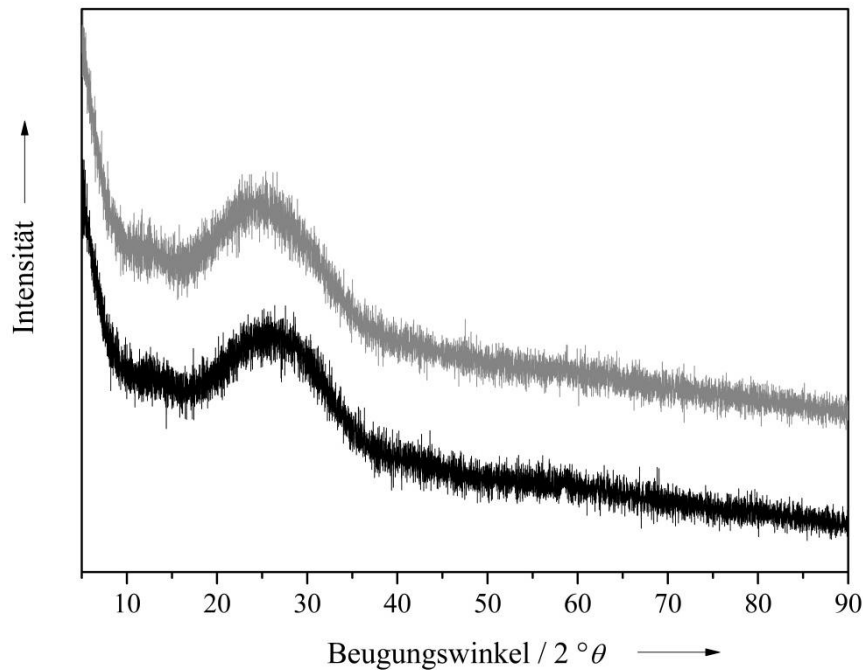


Abbildung 75: XRD der Goldalgen *Synura petersenii* (schwarz) und *Mallomonas caudata* (grau) vor der Konversion.

Mittels IR-Spektroskopie wurden die beiden Goldalgen detaillierter charakterisiert. In Abbildung 76 sind die IR-Spektren für *Synura petersenii* (schwarz) und *Mallomonas caudata* (blau) gezeigt. Die charakteristischen Banden können zum Teil der Anwesenheit von Wasser zugeordnet werden. Des Weiteren lassen sich Schwingungsbanden finden, die der organischen Matrix der Goldalgen und der Anwesenheit von Silica entsprechen.

4. Ergebnisse und Diskussion

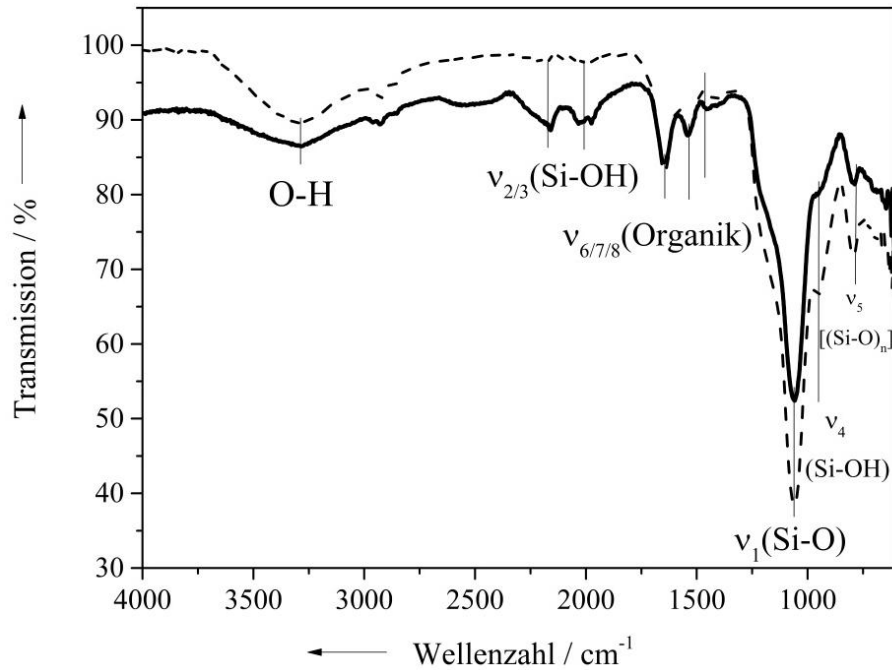


Abbildung 76: IR-Spektren der Goldalgen *Synura petersenii* (schwarz) und *Mallomonas caudata* (schwarz gestrichelt) vor der Konversion.

Zur weiteren Charakterisierung der Goldalgen wurden Aufnahmen mittels Energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) angefertigt. Diese sind exemplarisch für *Synura petersenii* in Abbildung 77 zu sehen. Die EDX-Aufnahme von *Mallomonas caudata* sieht nahezu identisch aus und wird deswegen an dieser Stelle nicht gezeigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

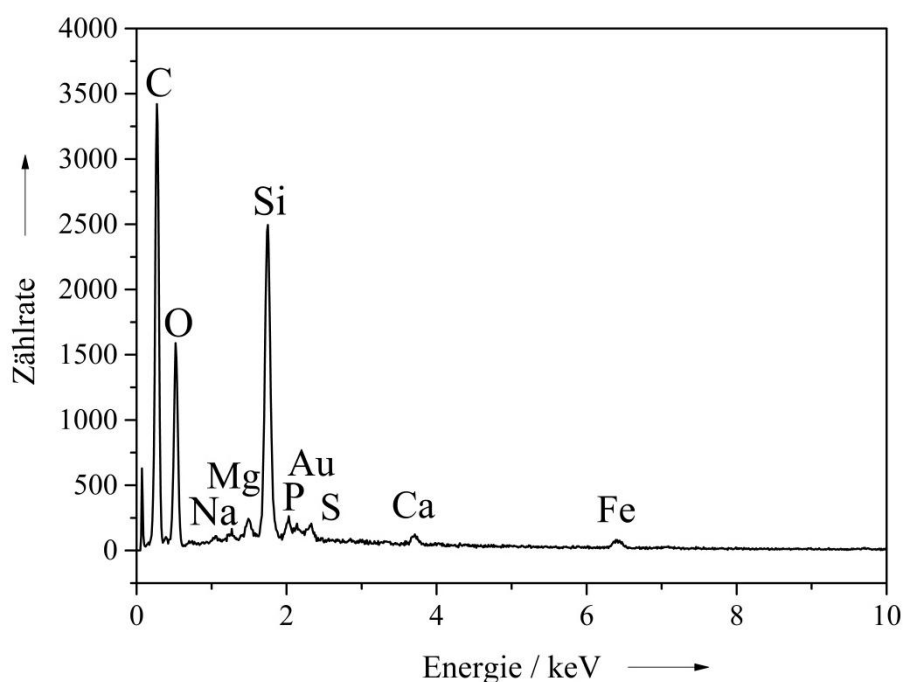


Abbildung 77: EDX-Aufnahme der Goldalge *Synura petersenii* vor der Konversion.

Es ist deutlich zu erkennen, dass neben Silicium, welches aufgrund der Anwesenheit von Silica detektiert wird, noch weitere Elemente nachgewiesen werden konnten. Neben Kohlenstoff, welches auch aufgrund des verwendeten Kohlepads detektiert wird, finden sich noch die Elemente Natrium, Magnesium, Aluminium, Schwefel, Calcium und Eisen. Die Anwesenheit von Gold kann auf das Sputtern zur Erhöhung der Leitfähigkeit der Probe mit Gold-Palladium zurückgeführt werden. Weitere der detektierten Elemente sind in der Kultivierungslösung zu finden. Jedoch kann nicht festgestellt werden, ob die Metalle aufgrund der organischen Matrix der Goldalgen oder aufgrund der Salze aus dem Kulturmedium detektiert wurden.

Nach den Konversionsexperimenten wurden zunächst die Strukturen der Goldalgen mittels Rasterelektronenmikroskopie betrachtet. In Abbildung 78 sind die REM-Aufnahmen von *Synura petersenii* nach der Konversion gezeigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

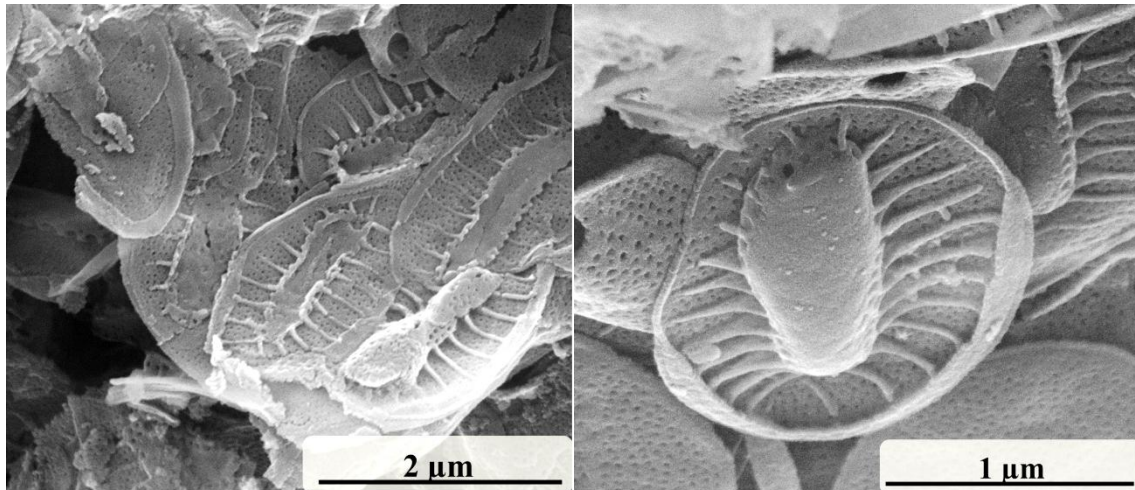


Abbildung 78: REM-Aufnahmen der Goldalge *Synura petersenii* nach der Konversion.

Die Umwandlungsexperimente führen zu einer guten Replikation der ursprünglichen Struktur der Goldalge *Synura petersenii*. Alle charakteristischen Strukturen wie das Porenfeld und der Keil, die auch schon vor der Umwandlung zu erkennen waren, sind gut zu erkennen. Allerdings ist auch sichtbar, dass die Strukturen teilweise zerbrochen sind. Die Fragilität der Strukturen von Goldalgen wurde bereits beschrieben.^[196] Die mechanische Stabilität der Strukturen ist somit sehr gering.

In Abbildung 79 sind die REM-Aufnahmen für *Mallomonas caudata* gezeigt.

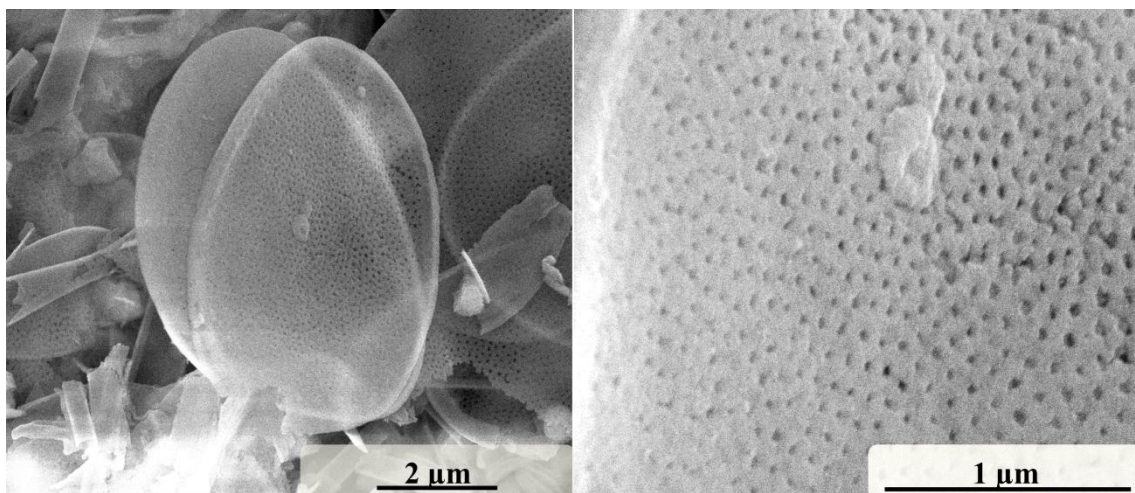


Abbildung 79: REM-Aufnahmen der Goldalge *Mallomonas caudata* nach der Konversion.

Die Strukturen von *Mallomonas caudata* wurden durch die chemische Konversion und die Handhabung deutlicher zerstört. Die Borsten sind gebrochen und mittels REM nicht mehr einheitlich darzustellen. Lediglich der Schild der Goldalge blieb erhalten und zeigte,

4. Ergebnisse und Diskussion

wie auch schon bei *Synura petersenii* zu beobachten war, die definierte Porenstruktur wie vor den Konversionsreaktionen.

Die vollständige Umsetzung der Reaktion wurde mittels EDX überprüft. In Abbildung 80 ist das EDX von *Synura petersenii* nach der Umwandlung abgebildet.

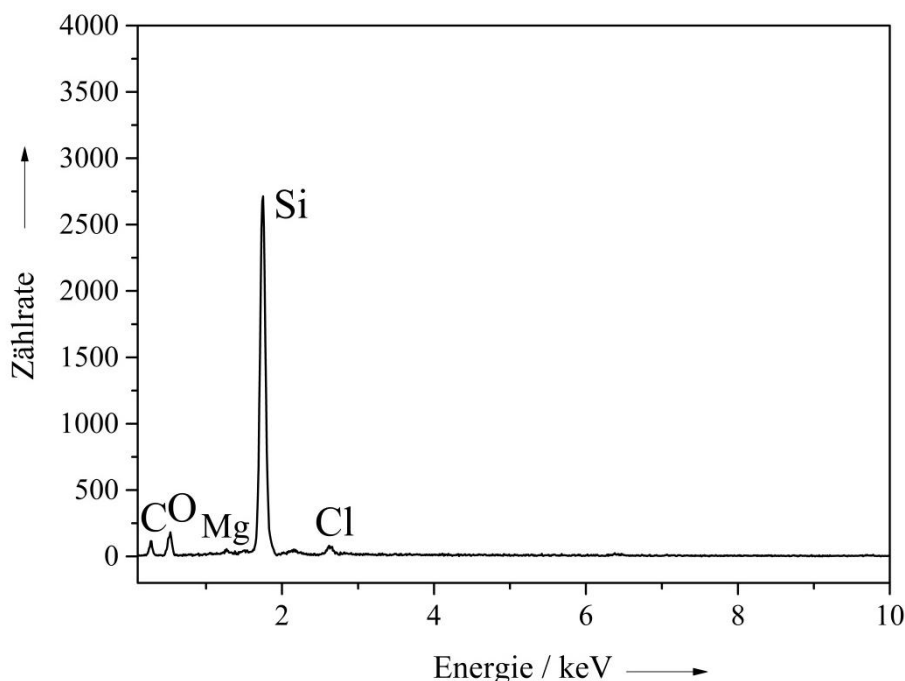


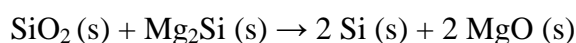
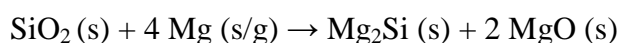
Abbildung 80: EDX der Goldalge *Synura petersenii* nach der Konversion.

Wie zu erkennen ist, sind außer Silicium nur noch Kohlenstoff, Sauerstoff und Spuren von Magnesium und Chlor detektiert worden. Kohlenstoff kann dem Kohlepad, auf welchem die Goldalgen fixiert wurden, zugeordnet werden. Sauerstoff, Magnesium und Chlor können dem Waschvorgang oder nicht vollständig umgesetzten Silica zugeordnet werden. Bei der Reaktion entsteht Magnesiumoxid (MgO), welches mittels halbkonzentrierter Salzsäure (HCl_{ag}) entfernt wird. Möglich ist, dass der Waschvorgang nicht vollständig durchgeführt wurde und somit leichte Spuren der beteiligten Elemente hinterlassen hat.

Ähnliche Ergebnisse fanden BAO *et al.*, die zeigten, dass die chemische Konversion von Diatomeen mittels Magnesium zur Bildung von Silicium führt. Das entstandene Magnesiumoxid wurde dabei mit Salzsäure oder Flusssäure ausgewaschen. Das mehrstündige Auswaschen mit Salzsäure führte zu ähnlichen Ergebnissen wie die hier beschriebenen. Mittels Energiedispersiver Röntgenspektroskopie konnten auch BAO *et al.* noch einen restlichen Anteil von Sauerstoff und Kohlenstoff ermitteln. Das Auswaschen mittels Flusssäure verlief vollständig, und es konnten keine weiteren

4. Ergebnisse und Diskussion

Rückstände nachgewiesen werden, da Flusssäure auch in der Lage ist, Silica zu lösen.^[185] SANDHAGE *et al.* zeigten, dass die Umwandlung von Diatomeen mittels Magnesium unter Argonatmosphäre nicht zur Bildung von Silicium führt, da dieses in einem Zweiphasengemisch aus Silicium und Magnesium vorliegt, welches sich nicht auf der Oberfläche der Diatomeen abscheidet, sondern separiert vorliegt. Die EDX-Spektren zeigten die Abwesenheit von Silicium und lediglich die Bildung von Magnesiumoxid.^[173, 180, 197] Dieser Effekt konnte bei den durchgeführten Versuchen nicht beobachtet werden. Die Bildung der binären Mischphase Magnesiumsilicid (Mg_2Si) wird in der Literatur beschrieben. Allerdings findet die Bildung der Mischphase lediglich als Zwischenprodukt statt, welches im weiteren Schritt mit Silica zu Silicium und Magnesiumoxid reagiert.^[182]



Diese Reaktionsgleichungen entsprechen eher den erhaltenen Ergebnissen, da die Bildung von Silicium mittels EDX nachgewiesen werden konnte. YAMADA *et al.* zeigten zudem, dass es möglich ist Magnesiumsilicid-Pulver in Silicium umzuwandeln.^[186] Zudem reagiert Magnesiumsilicid oberhalb von 450 °C mit Sauerstoff zu Magnesiumoxid und Silicium.^[198] Da die Konversion unter Sauerstoffatmosphäre durchgeführt wird, ist das Vorliegen der binären Mischphase nach der Reaktion somit ausgeschlossen.

4.3.4 Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Silica-mineralisierenden Strukturen der Chrysophyceae mittels einer Hochtemperatur-Konversionsreaktion in Silicium umzuwandeln. Dabei wurden die vom Arbeitskreis BOENIGK zur Verfügung gestellten Goldalgen *Mallomonas caudata* und *Synura petersenii* zunächst vom Medium abgetrennt, getrocknet und charakterisiert. Es zeigte sich, dass die Goldalgen zu ungefähr 50 % aus Silica bestehen und charakteristische, strukturelle Merkmale aufweisen. So konnte mittels Rasterelektronenmikroskopie bei *Synura petersenii* die Ausbildung eines charakteristischen „Skeletts“ festgestellt werden, während *Mallomonas caudata* aus einer gezackten, hohlen Borste und einem Schild bestanden. Beide Goldalgen besaßen Porenfelder. Mittels Röntgenbeugung wurden

4. Ergebnisse und Diskussion

amorphe Diffraktogramme erhalten, was durch die Anwesenheit des Silicas in den Strukturen zu erwarten war. Die IR-Spektren zeigten neben Wasser auch Schwingungsbanden des organischen und des mineralisierten Anteils. Mittels EDX konnten verschiedene Elemente nachgewiesen werden, die vor allem dem Kulturmedium und Silica zugeordnet wurden. Die Umwandlungsexperimente wurden in einem abgeschlossenen Konversionsreaktor aus hitzebeständigem Stahl mit Magnesium-Pulver durchgeführt. Dazu wurde der Reaktor für mehrere Stunden auf 900 °C erhitzt. Das gebildete Magnesiumoxid wurde mittels halbkonzentrierter Säure von den Goldalgen abgewaschen. Die Charakterisierung der Goldalgen *Mallomonas caudata* und *Synura petersenii* erfolgte mittels REM-Aufnahmen und EDX. In den REM-Aufnahmen zeigte sich, dass sowohl die Strukturen von *Mallomonas caudata*, als auch von *Synura petersenii*, durch die Konversionsreaktion stark beansprucht wurden. So war die gezackte Borste der *Mallomonas caudata* nicht mehr vollständig zu identifizieren. Die charakteristischen Merkmale der Goldalgen, wie unter anderem das Porenfeld, waren dennoch deutlich zu erkennen. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels EDX untersucht. Neben Silicium wurde auch ein geringer Anteil an Sauerstoff, Magnesium, Chlor und Kohlenstoff detektiert. Die Anwesenheit dieser Elemente konnte dem nicht vollständigen Entfernen des Magnesiumoxids und dem Waschvorgang zugeordnet werden. Die Umwandlung der Silica-mineralisierenden Goldalgen zu Silicium konnte demnach realisiert werden und ist auch für Goldalgen mit ihren charakteristischen Strukturen gut geeignet.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit der Firma SCHAEFER KALK die Reduzierung von Naturlatex-Allergenen durch Adsorption an unterschiedliche Calciumcarbonate, sowie die Desorption dieser und die Freisetzung der Allergene aus selbst hergestellten Werkstücken untersucht. Dazu wurden die polymorphen, wasserfreien Calciumcarbonate Calcit, Vaterit und Aragonit hergestellt und durchgehend charakterisiert. Zudem wurden sechs weitere Calciumcarbonat-Proben von der Firma SCHAEFER KALK zur Verfügung gestellt und charakterisiert.

Es zeigte sich, dass die vier Allergene, Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02 im wässrigen Medium an die unterschiedlichen Calciumcarbonate adsorbierten. Der Einfluss des Mediums wurde durch die Verwendung von PBS untersucht und führte zu signifikant verminderter Adsorption der Allergene an die verwendeten Substrate. Der Einfluss der Ausgangskonzentration, sowie der Einfluss der Temperatur, wurden ebenfalls untersucht. Es zeigte sich, dass mit Ausnahme des Allergens Hev b 3 keine Abhängigkeit der Adsorption von der Ausgangskonzentration der Allergene vorlag. Eine zunehmende Adsorption mit steigender Temperatur konnte bei allen Versuchen nicht nachgewiesen werden. Die spezifische Oberfläche, die Morphologie und die Polymorphie hatten dabei keinen Einfluss auf die Adsorption der Allergene (mit Ausnahme der plättchenförmigen Probe SK-6, die aus einem Vaterit/Calcit-Gemisch bestand).

Mittels Untersuchungen der Desorption der Allergene von den Substraten konnte festgestellt werden, dass die Allergene Hev b 1 und Hev b 3 zu ungefähr 50 % von den Substraten desorbierten, während die Allergene Hev b 5 und Hev b 6.02 nicht bzw. nur geringfügig desorbierten.

Um die Anwendung der Calciumcarbonate zur Reduzierung der Latex-Allergene in *dipped products* zu demonstrieren, konnten kleine Naturlatex-Werkstücke als Handschuh-Modell mit eingebautem Calciumcarbonat in der Latex-Matrix dargestellt und die Freisetzung der Allergene aus diesen untersucht werden. Es zeigte sich, dass die Allergene aus den Werkstücken, trotz eingebauten Calciumcarbonaten, zum großen Teil freigesetzt wurden und nicht oder nur minimal an die Calciumcarbonat-Substrate adsorbierten.

In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss des Zugabezeitpunkts der Calciumcarbonate und der Einfluss der Freisetzungskinetik validiert. Es zeigte sich, dass die Freisetzung der Allergene durch die Variation des Darstellungsprozess deutlich

5. Zusammenfassung

minimiert werden konnte und dass die Wahl der Freisetzungsmethode ebenfalls einen deutlichen Einfluss auf die Freisetzung der Allergene hat.

Die Wahl einer Calciumcarbonat-Phase als geeignetes Adsorbens zur Einbettung in Naturlatex-Werkstücke konnte nicht getroffen werden, da die Proteine an die Calciumcarbonate unabhängig der spezifischen Oberfläche und Morphologie adsorbierten bzw. desorbierten und kein Substrat signifikant bessere Eigenschaften aufwies als die anderen.

Ferner wurde für lösungskalorimetrische Untersuchungen ACC synthetisiert. Die bestimmten Lösungsenthalpien der kristallinen Polymorphe entsprachen den Literaturdaten. Die Lösungsenthalpie von ACC war zu gering im Vergleich mit der Literatur und konnte mit der Instabilität des ACCs und dem variablen Kristallwassergehalt innerhalb der Probe in Zusammenhang gebracht werden.

Des Weiteren wurden DNA-funktionalisierte Calciumcarbonat-Nanopartikel in einem halbkontinuierlichen Fällungsprozess synthetisiert, welche sich nach dem Aufreinigungsprozess mittels PEI umladen ließen. Diese Partikel wurden kolloid-chemisch charakterisiert und für zellbiologische Untersuchungen verwendet. Transfektionsuntersuchungen an HeLa-Zellen zeigten, dass die Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel nicht von den Zellen aufgenommen wurden, während die mittels PEI umgeladenen Nanopartikel konzentrationsabhängige Transfektionseffizienzen zeigten. Durch MTT-Tests konnte die ebenfalls konzentrationsabhängige zelltoxische Wirkung der mit PEI umgeladenen Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel ermittelt werden. Die Calciumcarbonat-DNA-Nanopartikel waren dahingegen nicht zelltoxisch.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die chemische Konversion von Chrysophyceae (Goldalgen) beschrieben. Die verwendeten Goldalgen *Mallomonas caudata* und *Synura petersenii* wurden vor den Umwandlungsexperimenten eingehend bezüglich der kennzeichnenden strukturellen Merkmale charakterisiert. Die Bildung von Silicium aus den Silica-mineralisierenden Strukturen wurde mittels Magnesium-Pulver, einem Konversionsreaktors aus hitzebeständigem Stahl und hoher Temperatur realisiert. Die Umwandlung der Silica-mineralisierenden Goldalgen zu Silicium konnte realisiert werden. Die Vollständigkeit der Konversionsreaktion wurde mittels EDX überprüft.

6. Literaturverzeichnis

- [1] W. Borchardt-Ott, *Kristallographie: Eine Einführung für Naturwissenschaftler*, Springer, Berlin **2008**.
- [2] K. T. Wilke, J. Bohm, *Kristallzüchtung*, VEB Verlag der deutschen Wissenschaften, Berlin **1988**.
- [3] J. Garcia-Carmona, J. Gomez Morales, R. Rodriguez Clemente, *J. Cryst. Growth* **2003**, 249, 561–571.
- [4] A. E. Nielsen, *Krist. Techn.* **1969**, 1, 17–38.
- [5] J. Garcia-Carmona, J. Gomez Morales, R. Rodriguez Clemente, *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, 261, 434–440.
- [6] D. Gebauer, *A novel view on the early etage of crystallization*, Dissertation, Universität Potsdam, **2008**.
- [7] R. Becker, W. Döring, *Ann. Phys.* **1935**, 24, 719–752.
- [8] A. S. Meyerson, *Handbook of industrial crystallization*, Butterworth-Heinemann, Woburn **2002**.
- [9] J. W. Mullin, *Crystallization*, Butterworth-Heinemann, Woburn **2001**.
- [10] Lieser, K. H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1969**, 6, 206–221.
- [11] W. Kossel, *Naturwissenschaften* **1930**, 44, 901–910.
- [12] W. Kossel, *Ann. Phys.* **1938**, 7, 651–660.
- [13] P. G. Vekilov, *Cryst. Growth Des.* **2007**, 7, 2796–2810.
- [14] O. Knacke, I. N. Stranski, *Ergebnisse der Exakten Naturwissenschaften*, Vol. 26, Springer Berlin Heidelberg **1952**.
- [15] Van Santen, R. A., *J. Phys. Chem.* **1984**, 24, 5768–5769.
- [16] S. Mann, *Biom mineralization principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*, Oxford University Press, Oxford **2001**.
- [17] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer, Berlin, Heidelberg **2002**.
- [18] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel, C. A. Mirkin, *Angew. Chem.* **2010**, 19, 3352–3366.
- [19] F. Kim, S. Connor, H. Song, T. Kuykendall, P. D. Yang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3673–3677.
- [20] B. Wiley, Y. Sun, B. Mayers, Y. Xia, *Eur. J. of Chem. Bio.* **2005**, 11, 454–463.
- [21] W. Wu, Q. He, C. Jiang, *Nanoscale Res. Lett.* **2008**, 3, 397–415.

6. Literaturverzeichnis

- [22] I. Robinson, C. Alexander, L. D. Tung, D. G. Fernig, Thanh, N. T. K., *J. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1421–1423.
- [23] T. Welzel, I. Radtke, W. Meyer-Zaika, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2213–2217.
- [24] A. Peetsch, C. Greulich, D. Braun, C. Stroetges, H. Rehage, B. Siebers, M. Köller, M. Epple, *Colloids Surf., B* **2013**, 724–729.
- [25] H. Urch, C. Geismann, M. Ulbricht, M. Epple, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2006**, *37*, 422–425.
- [26] Malvern-Instruments, *Zetasizer nano series, user manual* **2003**.
- [27] D.H. Everett, *Grundzüge der Kolloidwissenschaft*, Steinkopf, Darmstadt **1992**.
- [28] G. Wedler, *Chemisorption: An Experimental Approach*, Butterworth, London, Boston **1970**.
- [29] W. A. Atkins, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, New York **2004**.
- [30] S. Ross, J. P. Olivier, *Adv. Chem.* **1961**, *33*, 301–308.
- [31] S. Brunauer, Emmett, P. H., E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *2*, 309–319.
- [32] J. E. Butler, *J. Immunoassay* **2000**, *2-3*, 165–209.
- [33] R. M. Lequin, *Clin. Chem.* **2005**, *12*, 2415–2418.
- [34] A. F. Hollemann, N. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, de Gruyter **2007**.
- [35] G. Montes-Hernandez, F. Renard, N. Geoffroy, L. Charlet, J. Pironon, *J. Cryst. Growth* **2007**, *1*, 228–236.
- [36] Y. S. Han, G. Hadiko, M. Fuji, M. Takahashi, *J. Cryst. Growth* **2005**, *276*, 541–549.
- [37] M. Kitamura, *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *236*, 318–327.
- [38] L. Moore, J. P. Hopwood, R. J. Davey, *J. Cryst. Growth* **2004**, *261*, 93–98.
- [39] R. Ebermann, I. Elmadfa, *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung*, Springer Wien **2011**.
- [40] P. Kaempfe, *Kristallisation, Modifikation und Adsorptionseigenschaften von Calciumcarbonat sowie Untersuchung eines oszillierenden Kristallisationssystems*, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, **2011**.
- [41] T. Z. Forbes, A. V. Radha, A. Navrotsky, *Geochim. Cosmochim. Acta* **2011**, *24*, 7893–7905.
- [42] H. Nebel, M. Epple, *Z. anorg. allg. Chem.* **2008**, *634*, 1439–1443.
- [43] D. Gebauer, H. Cölfen, A. Verch, M. Antonietti, *Adv. Mater.* **2009**, *4*, 435–439.
- [44] C. Y. Tai, C.-k. Chen, *Chem. Eng. Sci.* **2008**, *14*, 3632–3642.

6. Literaturverzeichnis

- [45] R.-Q. Song, H. Cölfen, *Cryst. Eng. Comm.* **2011**, 5, 1249.
- [46] A. Hernández-Hernández, A. B. Rodríguez-Navarro, J. Gómez-Morales, C. Jiménez-Lopez, Y. Nys, J. M. García-Ruiz, *Cryst. Growth Des.* **2008**, 8.
- [47] M. Neumann, M. Epple, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 1953–1957.
- [48] K. Dahl, B. Buchardt, *J. Sediment. Res.* **2006**, 3, 460–471.
- [49] A. Sarkar, S. Mahapatra, *Cryst. Growth Des.* **2010**, 10, 2129–2135.
- [50] S. Weiner, Y. Levi-Kalishman, L. Addadi, *Connect. Tissue Res.* **2003**, 44, 214–218.
- [51] N. Watabe, *Cryst. Growth Charact.* **1981**, 4, 99–147.
- [52] B. Njegic-Dzakula, L. Brecevic, G. Falini, D. Kralj, *Croat. Chem. Acta* **2001**, 84, 301–314.
- [53] J. Alzenberg, G. Lambert, S. Weiner, L. Addadi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 32–39.
- [54] H. S. Lee, T. H. Ha, K. Kim, *Mater. Chem. Phys.* **2005**, 93, 376–382.
- [55] I. M. Weiss, N. Tuross, L. Addadi, S. Weiner, *J. Exp. Zool.* **2002**, 293, 478–491.
- [56] H. Nebel, M. Neumann, C. Mayer, M. Epple, *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 7874–7879.
- [57] J. H. Cartwright, A. G. Checa, J. D. Gale, D. Gebauer, C. I. Sainz-Díaz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 48, 11960–11970.
- [58] L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 959–970.
- [59] L. Addadi, S. Weiner, M. Geva, *Z. Kardiol.* **2001**, 3, III/92–III/98.
- [60] B. N. Bachra, O. R. Trautz, S. L. Simon, *Arch. Oral Biol.* **1965**, 5, 731–738.
- [61] N. Koga, Y. Nakagoe, H. Tanaka, *Thermochim. Acta* **1998**, 1-2, 239–244.
- [62] L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, *Adv. Mater.* **2003**, 12, 959–970.
- [63] M. Maciejewski, H. R. Oswald, A. Reller, *Thermochim. Acta* **1994**, 315–328.
- [64] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation*, B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden **2003**.
- [65] F. Boßelmann, *Charakterisierung biogener Mineralien zum Verständnis der Biomineralisation und Anwendung dieser Prinzipien auf die Kristallisation verschiedener calciumbasierter Materialien*, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, **2007**.
- [66] H. Lowenstam, D. P. Abbot, *Science* **1975**, 188, 363–365.
- [67] R. J. Davey, P. T. Cardew, *J. Cryst. Growth* **1986**, 79, 648–653.
- [68] H. Hull, A. Turnbull, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1973**, 3, 685–694.
- [69] H. Lowenstam, *Science* **1981**, 211, 1126–1131.
- [70] H. Rademaker, M. Launspach, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2011**, 222–227.

6. Literaturverzeichnis

- [71] J. A. Simões, M. E. M da Piedade, *Molecular Energetics*, Oxford University Press, New York **2008**.
- [72] G. Wolf, J. Lerchner, H. Schmidt, H. Gamsjager, E. Königsberger, P. Schmidt, *J. Therm. Anal.* **1996**, 46, 353–359.
- [73] D. Wagman, W. H. Evans, V. B. Parker, R. H. Schumm, I. Halow, S. M. Bailey, K. L. Churney, R. L. Nutall, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1982**, 11.
- [74] G. Wolf, E. Königsberger, H. G. Schmidt, L. C. Königsberger, H. Gamsjager, *J. Therm. Anal. Calorim.* **2000**, 60, 463–472.
- [75] A. V. Radha, T. Z. Forbes, C. E. Killian, P. U. Gilbert, A. Navrotsky, *PNAS* **2010**, 38, 16438–16443.
- [76] G. Wolf, C. Günther, *J. Therm. Anal. Cal.* **2001**, 65.
- [77] M. Asrul, S. Kawahara, M. Y. Amir-Hashim, *J. Rubb. Res.* **2007**, 10, 89–96.
- [78] S. Manroshan, M. Y. Amir-Hashim, K. Booten, *J. Rubb. Res.* **2007**, 10, 161–170.
- [79] H. H. Greve, *Rubber, 2. Natural*, Wiley-VCH, Weinheim **2012**.
- [80] D. Beezhold, K. Hortin, V. Hickes, J. Daddona, D. Kostyal, *J. Long.-Term. Eff. Med.* **2003**, 13, 21–30.
- [81] C. Peixinho, P. Tavares-Ratado, M. R. Tomás, L. Taborda-Barata, C. T. Tomaz, *Br. J. Dermatol.* **2008**, 1, 132–136.
- [82] R. F. Edlich, C. R. Woodard, L. G. Hill, C. L. Heather, *J. Long.-Term. Eff. Med.* **2003**, 13, 11–19.
- [83] H. M. Lim, M. Y. Amir-Hashim, *J. Rubb. Res.* **2011**, 14, 41–50.
- [84] H. Tamm, *International Rubber Glove Conference & Exhibition* **2010**, 1–12.
- [85] K. Wrangsjö, A. Boman, C. Lidén, B. Meding, *Contact Dermatitis* **2012**, 4, 165–171.
- [86] X. Baur, Z. Chen, H. Allmers, U. Beckmann, J. W. Walther, *Allergology Int.* **1995**, 20, 105–111.
- [87] M. Raulf-Heimsoth, V. Kampen, S. Kespohl, I. Sander, R. Merget, T. Brüning, *Bundesgesundheitsbl.* **2012**, 3, 363–372.
- [88] A. B. Czuppon, Z. Chen, S. Rennert, T. Engelke, H. E. Meyer, M. Heber, X. Baur, *J. Allergy Clin. Immunol.* **1993**, 93, 690–697.
- [89] M. S. Dennis, W. J. Henzel, J. Bell, W. Kohr, D. R. Light **1989**, 264, 18618–18626.
- [90] Z. Chen, A. Posch, M. Raulf-Heimsoth, H. P. Rihs, X. Baur, *Allergy* **1997**, 52, 97.
- [91] H. Alenius, T. Palosuo, K. Kelly, V. Kurup, T. Reunala, S. Makinen-Kiljunen, K. Turjanmaa, J. Fink, *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1993**, 102, 61–66.

6. Literaturverzeichnis

- [92] Z. Chen, A. Posch, M. Raulf-Heimsoth, X. Baur, *J. Allergy Clin. Immunol.* **1996**, 97, 428.
- [93] H. Alenius, N. Kalkkinen, T. Reunala, K. Turanmaa, T. Palosuo, *J. Immunol.* **1996**, 156, 505–509.
- [94] D. Koh, V. Ng, Y.-H. Leow, C. L. Goh, *Br. J. Dermatol.* **2005**, 5, 954–959.
- [95] T. Palosuo, I. Antoniadou, F. Gottrup, P. Phillips, *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **2011**, 3, 234–246.
- [96] A. Posch, Z. Chen, M. Raulf-Heimsoth, X. Baur, *Clin. Exp. Allergy* **1998**, 28, 134–140.
- [97] T. Palosuo, *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.* **1997**, 8, 1184–1187.
- [98] O. Breitenender, O. Schneider, *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1998**, 116, 83–92.
- [99] C. A. Reyes-López, A. Hernández-Santoyo, M. Pedraza-Escalona, G. Mendoza, A. Hernández-Arana, A. S. Rodríguez-Romero, P. Llinas, S. Orozco-Martinez, J. Huerta, R. Rodriguez, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 314, 123–130.
- [100] S. Kawahara, W. Klinklai, H. Kuroda, Y. Isono, *Polym. Adv. Technol.* **2004**, 4, 181–184.
- [101] W. Klinklai, T. Saito, S. Kawahara, K. Tashiro, Y. Suzuki, J. T. Sakdapipanich, Y. Isono, *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, 2, 555–559.
- [102] O. Chaikumpollert, Y. Yamamoto, K. Suchiva, S. Kawahara, *Colloid Polym. Sci.* **2012**, 4, 331–338.
- [103] U. Ratnayake, K. Makuuchi, F. Yoshii, *J. Rubb. Res.* **2001**, 4, 153–163.
- [104] C. M. Deng, M. Chen, N. J. Ao, D. Yan, Z. Q. Zheng, *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, 5, 3442–3447.
- [105] S. Poompradub, T. Luthikaviboon, S. Linpoo, R. Rojanathanes, P. Prasassarakich, *Polym. Bull.* **2011**, 7, 965–977.
- [106] H. H. Cai, S. D. Li, G. R. Tian, H. B. Wang, J. H. Wang, *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, 87, 982–985.
- [107] J. Khamsook, R. Magaraphan, *Effect of fillers on the surface properties of NR and DPNR sheets*, International Conference on Latex and Latex Based Products, Frankfurt **2006**.
- [108] Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, *IPA-Report 4: Abschätzung des allergisierenden Potenzials von naturlatexprodukten*, Bochum.

6. Literaturverzeichnis

- [109] F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2006**.
- [110] R. Miller, D. O. Grigoriev, J. Krägel, A. V. Makievski, J. Maldonado-Valderrama, M. Leser, M. Michel, V. B. Fainerman, *Food Hydrocolloids* **2005**, *19*, 479–483.
- [111] K. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imamura, *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *91*, 233–244.
- [112] T. Arnebrant, K. Burton, T. Nylander, *J. Colloid Interface Sci.* **1986**, *119*, 383–390.
- [113] D. V. Okhrimenko, J. Nissenbaum, M. P. Andersson, M. H. Olsson, S. L. Stipp, *Langmuir* **2013**, *29*, 11062–11073.
- [114] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *162*, 87–106.
- [115] M. Palacio, B. Bhushan, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* **2013**, *370*, 2321–2347.
- [116] K. Wang, C. Zhou, Y. Hong, X. Zhang, *Interface Focus* **2012**, *3*, 259–277.
- [117] V. Hlady, J. Buijs, *Anal. Biotechnol.* **1996**, *7*, 72–77.
- [118] R. M. Hazen, *Am. Mineral.* **2006**, *91*, 1715–1729.
- [119] J. Plank, G. Bassioni, *Z. Naturforsch.* **2007**, *62b*, 1277–1284.
- [120] J. O. Amankonah, P. Somasundaran, *Colloids Surf., A* **1985**, *15*, 335–353.
- [121] P. Kaempfe, M. Epple, M. Vucak, C. Nover, *Adsorption of biomolecules on calcium carbonate*, Patent **2012**.
- [122] H. J. Cleaves, E. Crapster-Pregont, C. M. Jonsson, C. L. Jonsson, D. A. Sverjensky, R. A. Hazen, *Chemosphere* **2011**, *11*, 1560–1567.
- [123] S. Mann, D. D. Archibald, J. M. Didymus, T. Douglas, B. R. Heywood, F. C. Meldrum, N. J. Reeves, *Science* **1993**, *261*, 1286–1292.
- [124] H. Cölfen, *Nat. Mater.* **2010**, *12*, 960–961.
- [125] M. Harms, *Prinzipien der Biomineralisation*, Dissertation, Universität Ulm, **2006**.
- [126] C. L. Freeman, J. H. Harding, D. Quigley, P. M. Rodger, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *16*, 8175–8183.
- [127] D. J. Cooke, R. J. Gray, K. K. Sand, S. L. Stipp, J. A. Elliott, *Langmuir* **2010**, *18*, 14520–14529.
- [128] K. K. Sand, M. Yang, E. Makovicky, D. J. Cooke, T. Hassenkam, K. Bechgaard, S. L. Stipp, *Langmuir* **2010**, *19*, 15239–15247.
- [129] C. L. Freeman, I. Asteriadis, M. Yang, J. H. Harding, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *9*, 3666–3673.
- [130] J. de Reese, J. Plank, L. Struble, *J. Am. Ceram. Soc.* **2011**, *10*, 3515–3522.
- [131] R. M. Hazen, T. R. Filley, G. A. Goodfriend, *PNAS* **2001**, *98*, 5487–5490.

6. Literaturverzeichnis

- [132] J. F. Lambert, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2008**, 3, 211–242.
- [133] M. Marques, C. Marques, R. Loebenberg, M. Almikainzi, *Dissolution Technol.* **2011**, 5, 15–28.
- [134] C. Kojima, K. Watanabe, *J. Drug Delivery* **2012**, 2012, 1–4.
- [135] A. Baszkin, D. J. Lyman, *J. Biomed. Mater. Res.* **1980**, 14, 393–403.
- [136] F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1988**, 24, 247–260.
- [137] Y. Zhang, P. S. Cremer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 658–663.
- [138] J. Petrack, *Darstellung von Calciumcarbonat-Nanopartikeln und die Untersuchung der Adsorptionsfähigkeit von Farbstoffen*, Vertiefungsarbeit, Universität Duisburg-Essen, **2010**.
- [139] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C. W. Wu, V. S. Y. Lin, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, 1278–1288.
- [140] J. Kurreck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 1378–1398.
- [141] M. Eppele, K. Ganesan, R. Heumann, J. Klesing, A. Kovtun, S. Neumann, V. Sokolova, *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 18–23.
- [142] J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, L. Ruiz, Gonzalez-Calbet, J. M., M. Vallet-Regi, R. Heumann, M. Eppele, *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 6144–6148.
- [143] V. Sokolova, I. Radtke, R. Heumann, M. Eppele, *Biomaterials* **2006**, 27, 3147–3153.
- [144] I. Roy, S. Mitra, A. Maitra, S. Mozumdar, *Int. J. Pharm.* **2003**, 250, 25–33.
- [145] J. P. Burand, M. D. Summers, G. E. Smith, *Virology* **1980**, 101, 286–290.
- [146] G. L. Andreason, G. A. Evans, *Anal. Biochem.* **1989**, 180, 269–275.
- [147] M. R. Capecchi, *Cell* **1980**, 22, 479–488.
- [148] N. S. Yang, J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell, D. McCabe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 9568–9672.
- [149] D. G. Anderson, D. M. Lynn, R. Langer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 115, 3261–3266.
- [150] S. Jin, K. Ye, *Biotechnol. Prog.* **2007**, 23, 32–41.
- [151] V. Sokolova, A. Kovtun, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, E. Kubareva, E. A. Romanova, T. S. Oretskaya, R. Heumann, M. Eppele, *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, 721–727.
- [152] I. S. Zuhorn, J. B. Engberts, D. Hoekstra, *Eur. Biophys. J.* **2007**, 36, 349–362.
- [153] S. de Smedt, J. Demeester, W. E. Hennink, *Pharm. Res.* **2000**, 17, 113–126.
- [154] V. Sokolova, M. Eppele, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 120, 1402–1416.

6. Literaturverzeichnis

- [155] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *114*, 3260–3277.
- [156] C. Kneuer, M. Sameti, E. G. Haltner, T. Schiestel, H. Schirra, H. K. Schmidt, *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 257–261.
- [157] V. Sokolova, I. Radtke, R. Heumann, M. Epple, *Biomaterials* **2006**, *16*, 3147–3153.
- [158] V. Sokolova, D. Kozlova, T. Knutschke, J. Buer, A. M. Westendorf, M. Epple, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 7527–7535.
- [159] J. Klesing, *Untersuchung zur biologischen Aktivität funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel*, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, **2012**.
- [160] T. Welzel, W. Meyer-Zaika, M. Epple, *Chem. Commun.* **2004**, 1204–1205.
- [161] V. Sokolova, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, H. Cölfen, H. Rehage, A. Shukla, M. Epple, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2006**, *37*, 441–445.
- [162] Y. Ueno, H. Futagawa, Y. Takagi, A. Ueno, Y. Mizushhima, *J. Controlled Release* **2005**, *103*, 93–98.
- [163] S. Biradar, V. Goornavar, A. Periyakaruppan, J. Koehne, R. Jeffers, J. C. Hall, V. Ramesh, M. Meyyappan, G. T. Ramesh, *Nanotechnology* **2012**, *37*, 375601.
- [164] D. Shan, M. Zhu, E. Han, H. Xue, S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 648–654.
- [165] G. Montes-Hernandez, A. Fernández-Martínez, L. Charlet, D. Tisserand, F. Renard, *J. Cryst. Growth* **2008**, *11*, 2946–2953.
- [166] M. Kellermeier, D. Gebauer, E. Melero-García, M. Drechsler, Y. Talmon, L. Kienle, H. Cölfen, J. M. García-Ruiz, W. Kunz, *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *20*, 4301–4311.
- [167] W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos, *J. Controlled Release* **1999**, *60*, 149–160.
- [168] V. Sokolova, S. Neumann, A. Kovtun, S. Chernousova, R. Heumann, *J. Mater. Sci.* **2010**, *45*, 4952–4957.
- [169] D. J. Belton, O. Deschaume, S. V. Patwardhan, C. C. Perry, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 9947–9955.
- [170] Y. Fang, Q. Wu, M. B. Dickerson, Y. Cai, S. Shian, J. D. Berrigan, N. Poulsen, N. Kröger, K. H. Sandhage, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 5701–5710.
- [171] V. Sheppard, N. Poulsen, N. Kröger, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 1166–1175.
- [172] Z. Bao, E. M. Ernst, S. Yoo, K. H. Sandhage, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 474–478.

6. Literaturverzeichnis

- [173] K. H. Sandhage, M. B. Dickerson, P. M. Huseman, M. A. Caranna, J. D. Clifton, T. A. Bull, T. J. Heibel, W. R. Overton, M. E. A. Schoenwaelder, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 429–433.
- [174] N. Kröger, K. H. Sandhage, *MRS Bull.* **2010**, *35*, 122–126.
- [175] D. J. Belton, S. V. Patwardhan, V. V. Annenkov, E. N. Danilovtseva, C. C. Perry, *PNAS* **2008**, *105*, 5963–5968.
- [176] M. B. Dickerson, K. H. Sandhage, R. R. Naik, *Chem. Rev.* **2008**, *11*, 4935–4978.
- [177] P. Fratzl, *J. R. Soc., Interface* **2007**, *15*, 637–642.
- [178] F. Hustedt, *Kieselalgen (Diatomeen)*, Franckh, Stuttgart **1965**.
- [179] Y. Wang, J. Cai, Y. Jiang, X. Jiang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 453–460.
- [180] K. H. Sandhage, *JOM* **2010**, *62*, 32–43.
- [181] Y. Oumellal, N. Delpulech, D. Mazouzi, N. Dupre, J. Gaubicher, P. Moreau, P. Soudan, B. Lestriez, D. Guyomard, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 6201–6208.
- [182] A. Xing, J. Zhang, Z. Bao, Y. Mei, A. S. Gordin, K. H. Sandhage, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 6743–6745.
- [183] K. H. Sandhage, *Shaped Microcomponents via reactive conversion of synthetic microtemplates*, Patent **2002**.
- [184] L. Shen, X. Guo, X. Fang, Z. Wang, L. Chen, *J. Power Sources* **2012**, *213*, 229–232.
- [185] Z. Bao, M. R. Weatherspoon, S. Shian, Y. Cai, P. D. Graham, S. M. Allan, G. Ahmad, M. B. Dickerson, B. C. Church, Z. Kang, H. W. Abernathy, C. J. Summers, M. Liu, K. H. Sandhage, *Nature* **2007**, *446*, 172–175.
- [186] T. Yamada, H. Itahara, H. Yamane, *Mater. Lett.* **2013**, *98*, 157–160.
- [187] J. Slapeta, D. Moreira, P. Lopez-Garcia, *Proc. R. Soc. B* **2005**, *272*, 2073–2081.
- [188] A. Bresinsky, C. Körner, J. W. Kadereit, G. Neuhaus, U. Sonnewald, *Lehrbuch der Botanik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2008**.
- [189] C. van den Hoek, H. M. Jahns, D. G. Mann, *Algen*, Georg Thieme, Stuttgart, New York **1993**.
- [190] C. van den Hoek, *Algen*, Georg Thieme, Stuttgart **1978**.
- [191] K. Starmach, *Chrysophyceae und Haptophyceae*, Gustav Fischer, Stuttgart, New York **1985**.
- [192] K. Krammer, *Kieselalgen*, Franckh, Stuttgart **1986**.

6. Literaturverzeichnis

- [193] S. M. Adl, Simpson, Alastair G B, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Fredericq, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. McCourt, L. Mendoza, O. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegel, M. F. Taylor, *J. Eukaryot. Microbiol.* **2005**, 5, 399–451.
- [194] D. Remias, S. Jost, J. Boenigk, J. Wastian, C. Lütz, *Phycol. Res.* **2013**, 61, 277–285.
- [195] R. R. Guillard, C. Lorenzen, *J. Phycol.* **1972**, 8, 10–14.
- [196] M. B. Allen, *Annu. Rev. Microbiol.* **1969**, 23, 49.
- [197] Y. Cai, S. M. Allan, K. H. Sandhage, F. M. Zalar, *J. Am. Ceram. Soc.* **2005**, 7, 2005–2010.
- [198] J. Tani, M. Takahashi, H. Kido, *OP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* **2011**, 18, 142013.

7. Anhang

7.1 Daten der Adsorptionsergebnisse mit PBS als Extraktionsmittel

7 Anhang

Tabelle 34: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 3 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). Extraktionsmittel: PBS; $T=\text{RT}$.

(links: $c_o(\text{Hev b 3})=40 \text{ ng mL}^{-1}$; rechts: $c_o(\text{Hev b 3})=21 \text{ ng mL}^{-1}$)

	$c_o= 40 \text{ ng mL}^{-1}$					$c_o= 21 \text{ ng mL}^{-1}$				
Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	32	0,67	80,1	148	$3,87 \cdot 10^{12}$	16	0,32	78,3	71	$1,86 \cdot 10^{12}$
SK-2	32	0,63	81,3	28	$7,28 \cdot 10^{11}$	8	0,17	38,3	7	$1,93 \cdot 10^{11}$
SK-3	36	0,70	91,0	17	$4,57 \cdot 10^{11}$	17	0,33	80,3	8	$2,14 \cdot 10^{11}$
SK-4	35	0,71	87,6	69	$1,79 \cdot 10^{12}$	18	0,36	86,9	35	$9,03 \cdot 10^{11}$
SK-5	37	0,70	92,0	79	$2,07 \cdot 10^{12}$	14	0,28	68,9	32	$8,42 \cdot 10^{11}$
SK-6	35	0,69	88,4	42	$1,10 \cdot 10^{12}$	15	0,29	70,3	17	$4,52 \cdot 10^{11}$
C	32	0,67	81,1	317	$8,31 \cdot 10^{12}$	15	0,29	70,4	138	$3,62 \cdot 10^{12}$
A	37	0,70	91,8	142	$3,73 \cdot 10^{12}$	18	0,34	84,7	70	$1,84 \cdot 10^{12}$
V	32	0,64	79,8	919	$2,41 \cdot 10^{13}$	15	0,28	70,6	396	$1,04 \cdot 10^{13}$

7 Anhang

Tabelle 35: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 3 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). Extraktionsmittel: PBS; $T=\text{RT}$.

(links: $c_o(\text{Hev b 3})=13 \text{ ng mL}^{-1}$; rechts: $c_o(\text{Hev b 3})=7 \text{ ng mL}^{-1}$)

	$c_o= 13 \text{ ng mL}^{-1}$					$c_o= 7 \text{ ng mL}^{-1}$				
Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	8	0,15	59,3	34	$8,89 \cdot 10^{11}$	0	0,00	0,0	0,00	0
SK-2	9	0,17	69,1	8	$1,98 \cdot 10^{11}$	1	0,02	14,9	1	$2,25 \cdot 10^{10}$
SK-3	9	0,18	73,1	4	$1,16 \cdot 10^{11}$	3	0,06	47,4	2	$4,07 \cdot 10^{10}$
SK-4	8	0,16	65,1	16	$4,12 \cdot 10^{11}$	3	0,05	40,0	5	$1,33 \cdot 10^{11}$
SK-5	1	0,01	51	1	$3,73 \cdot 10^{10}$	3	0,05	36,9	5	$1,44 \cdot 10^{11}$
SK-6	10	0,20	80,8	12	$3,22 \cdot 10^{11}$	3	0,07	47,7	4	$1,07 \cdot 10^{11}$
C	2	0,03	13,0	17	$4,33 \cdot 10^{11}$	1	0,03	20,2	13	$3,44 \cdot 10^{11}$
A	1	0,02	9,2	5	$1,23 \cdot 10^{11}$	3	0,06	44,2	11	$3,00 \cdot 10^{11}$
V	11	0,23	87,6	326	$8,54 \cdot 10^{12}$	4	0,07	54,1	101	$2,64 \cdot 10^{12}$

7 Anhang

Tabelle 36: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 5 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). Extraktionsmittel: PBS; $T=\text{RT}$.

(links: $c_0(\text{Hev b 5})= 105 \text{ ng mL}^{-1}$; rechts: $c_0(\text{Hev b 5})= 55 \text{ ng mL}^{-1}$)

	$c_0= 105 \text{ ng mL}^{-1}$					$c_0= 55 \text{ ng mL}^{-1}$				
Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	34	0,70	32,3	156	$5,87 \cdot 10^{12}$	18	0,35	32,2	78	$2,92 \cdot 10^{12}$
SK-2	33	0,65	32,0	29	$1,08 \cdot 10^{12}$	0	0	2	0	0
SK-3	42	0,81	40,5	20	$7,65 \cdot 10^{11}$	45	0,88	81,6	22	$8,30 \cdot 10^{11}$
SK-4	99	2,02	94,5	194	$7,29 \cdot 10^{12}$	47	0,94	85,6	91	$3,40 \cdot 10^{12}$
SK-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SK-6	17	0,34	16,5	20	$7,70 \cdot 10^{11}$	0	0	0	0	0
C	103	2,11	98,1	1007	$3,78 \cdot 10^{13}$	52	1,04	94,4	493	$1,85 \cdot 10^{13}$
A	103	1,97	98,7	401	$1,51 \cdot 10^{13}$	52	1,02	94,1	208	$7,81 \cdot 10^{12}$
V	22	0,45	21,1	637	$2,39 \cdot 10^{13}$	44	0,84	79,9	1194	$4,49 \cdot 10^{13}$

7 Anhang

Tabelle 37: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 5 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m² Oberfläche ($N(\text{ads.})$). Extraktionsmittel: PBS; T=RT.

(links: $c_0(\text{Hev b 5}) = 28 \text{ ng mL}^{-1}$; rechts: $c_0(\text{Hev b 5}) = 13 \text{ ng mL}^{-1}$)

	$c_0 = 28 \text{ ng mL}^{-1}$					$c_0 = 13 \text{ ng mL}^{-1}$				
Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	27	0,54	96,5	119	$4,49 \cdot 10^{12}$	12	0,24	90,3	54	$2,02 \cdot 10^{12}$
SK-2	27	0,52	96,8	23	$8,63 \cdot 10^{11}$	12	0,23	92,9	10	$3,91 \cdot 10^{11}$
SK-3	27	0,51	97,9	13	$4,82 \cdot 10^{11}$	9	0,18	69,3	4	$1,66 \cdot 10^{11}$
SK-4	27	0,53	97,9	51	$1,92 \cdot 10^{12}$	12	0,24	92,7	23	$8,60 \cdot 10^{11}$
SK-5	27	0,52	97,3	59	$2,23 \cdot 10^{12}$	13	0,24	96,0	28	$1,04 \cdot 10^{12}$
SK-6	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0
C	28	0,58	100,0	276	$1,04 \cdot 10^{13}$	12	0,25	93,1	118	$4,42 \cdot 10^{12}$
A	26	0,49	91,8	101	$3,79 \cdot 10^{12}$	10	0,19	75,3	38	$1,42 \cdot 10^{12}$
V	22	0,44	78,6	632	$2,38 \cdot 10^{13}$	0	0	0	0	0

7 Anhang

Tabelle 38: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 6.02 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). Extraktionsmittel: PBS; $T=\text{RT}$.

(links: $c_o(\text{Hev b 5})= 108 \text{ ng mL}^{-1}$; rechts: $c_o(\text{Hev b 5})= 55 \text{ ng mL}^{-1}$)

	$c_o= 108 \text{ ng mL}^{-1}$					$c_o= 55 \text{ ng mL}^{-1}$				
Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	1	0,02	0,9	4	$5,70 \cdot 10^{11}$	0	0	0	0	0
SK-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SK-3	7	0,1	6,6	4	$4,49 \cdot 10^{11}$	0	0	0	0	0
SK-4	10	0,2	9,5	20	$2,59 \cdot 10^{12}$	0	0	0	0	0
SK-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SK-6	13	0,3	11,9	15	$1,94 \cdot 10^{12}$	0	0	0	0	0
C	31	0,6	28,4	300	$3,85 \cdot 10^{13}$	0	0	0	0	0
A	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0	0
V	13	0,3	11,7	371	$4,76 \cdot 10^{13}$	5	0,1	9,6	143	$1,83 \cdot 10^{13}$

7 Anhang

Tabelle 39: Angabe der adsorbierten Konzentration an Hev b 6.02 ($c(\text{ads})$), der adsorbierten Masse, bezogen auf die eingesetzte Masse an Calciumcarbonat ($m(\text{ads})$), der Adsorption in Prozent der eingesetzten Allergenmenge (Ads.), der adsorbierten Masse, bezogen auf die spezifische Oberfläche ($m(\text{ads})(\text{BET})$) und der berechneten Molekülanzahl pro m^2 Oberfläche ($N(\text{ads})$). Extraktionsmittel: PBS; $T=\text{RT}$.

(links: $c_o(\text{Hev b } 5)=23 \text{ ng mL}^{-1}$; rechts: $c_o(\text{Hev b } 5)=12 \text{ ng mL}^{-1}$)

	$c_o=23 \text{ ng mL}^{-1}$					$c_o=12 \text{ ng mL}^{-1}$				
Probe	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2	$c(\text{ads})$ / ng mL^{-1}	$m(\text{ads})$ / ng mg^{-1}	Ads. / %	$m(\text{ads})$ (BET) / ng m^{-2}	$N(\text{ads.})$ / m^2
SK-1	2	0,04	9,1	9	$1,14 \cdot 10^{12}$	3	0,1	26,9	13	$1,71 \cdot 10^{12}$
SK-2	0	0	0	0	0	3	0,1	24,5	2	$3,08 \cdot 10^{11}$
SK-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SK-4	4	0,1	19,4	9	$1,11 \cdot 10^{12}$	2	0,03	14,8	3	$3,70 \cdot 10^{11}$
SK-5	1	0,03	6,4	3	$4,37 \cdot 10^{11}$	4	0,1	34,7	9	$1,17 \cdot 10^{12}$
SK-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	6	0,1	24,4	57	$7,33 \cdot 10^{12}$	2	0,1	20,6	24	$3,05 \cdot 10^{12}$
A	5	0,1	23,3	20	$2,62 \cdot 10^{12}$	7	0,1	58,7	27	$3,40 \cdot 10^{12}$
V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

7.2 Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ACC	Amorphes Calciumcarbonat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
BET	Brunauer, Emmet, Teller
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EA	Elementaranalyse
EDX	<i>Energy Dispersive X-Ray spectroscopy</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HeLa	Henrietta Lacks
Hev b	<i>Hevea brasiliensis</i>
HSA	Humanes Serum Albumin
ICDD	<i>International Centre for Diffraction Data</i>
IR	Infrarotspektroskopie
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NRL	<i>Natural rubber latex</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDI	Polydispersitätsindex
PEI	Polyethylenimin
PSS	Polystyrolsulfonat
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SK	Schaefer Kalk
TG	Thermogravimetrie

7 Anhang

UV	Ultraviolett
Vis	<i>Visible</i>
XRD	<i>X-Ray Diffraction</i>

7.3 Chemikalienverzeichnis

<i>Chemikalie</i>	<i>Firma</i>
Ammoniak	Roth
Bentonit	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid-Hexahydrat	Riedel de Haen
Calciumnitrat-Tetrahydrat	Merck
Dispex [®] N40	BASF, zur Verfügung gestellt von SCHAEFER KALK
DNA < 50 bp	Sigma
DMEM	life technologies
DMSO	Applichem
EGFP-DNA	Universität Duisburg-Essen,
Hev b 1, Reinsubstanz	biomol
Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6.02	Universität Duisburg-Essen,
Kaliumcarbonat	Riedel de Haen
Kaliumhydroxid	VWR
Magnesium, Pulver	Merck
MTT	Sigma
NRL	Kuala Lumpur, zur Verfügung gestellt von CPR-Germany
NRL-Handschuhe	Profissimo, bezogen über Drogeriemarkt
PBS	life technologies
PEI	Sigma
Polyacrylsäure	Aldrich
Salzsäure	Sigma-Aldrich
Schwefel	Sigma-Aldrich
ZDEC	Aldrich
Zinkoxid	Fluka

7.4 Publikationsliste

Reguläre Publikationen in referierten wissenschaftlichen Fachzeitschriften

J. Petrack, S. Jost, J. Boenigk, M. Epple, *Magnesiothermic conversion of the silica-mineralizing golden algae *Mallomonas caudata* and *Synura petersenii* to elemental silicon with high geometric precision*, Beilstein J. Nanotechnol. **2014**, 5, 554–560.

J. Petrack, C. Nover, M. Epple, *Polymorphic calcium carbonate phases as adsorbents for allergens from natural rubber latex*, (eingereicht).

J. Petrack, T. Ruks, M. Epple, *Über die Brennbarkeit von hochprozentigen Spirituosen*, (angenommen).

Sonstige Publikationen

J. Petrack, M. Epple, *Adsorption von Biomolekülen an polymorphen Calciumcarbonat-Phasen*, Biomaterialien 14 (2013) 41.

Wissenschaftliche Vorträge (P=Poster, V=Vortrag)

26.–28. September 2013, Erlangen, Tagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, J. Petrack, M. Epple: *Adsorption von Biomolekülen an polymorphen Calciumcarbonat-Phasen*. (P, V)

7.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Über die Adsorption von Allergenen und Nukleinsäuren an
Calciumcarbonat sowie die chemische Umwandlung von Goldalgen in
elementares Silicium“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet zu haben.

Zudem erkläre ich, dass ich die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Essen, 17.02.2014

Janina Petrack

9. Danksagung

Ich danke,

Prof. Dr. Matthias Epple für das Überlassen der interessanten Themen und für die Unterstützung während der gesamten Promotionsphase.

ebenso Prof. Dr. Christian Mayer für die Übernahme des Koreferats.

meinen Kooperationspartnern Schaefer Kalk für die Anregung zu dem sehr interessanten Thema. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Christoph Nover für die konstruktive Zusammenarbeit und die Unterstützung während der Projektlaufzeit.

Prof. Dr. Jens Boenigk und Dr. Steffen Jost für die Zusammenarbeit und das Kultivieren der Goldalgen.

Prof. Dr. Manuel E. Minas da Piedade für die Hilfe bei den lösungskalorimetrischen Versuchen und Auswertungen.

CPR-Germany für das zur Verfügung stellen der Naturlatex-Dispersion.

Veronika Hiltenkamp und Kerstin Brauner für die Durchführung der Elementaranalyse und Atomabsorptionsspektroskopie.

Ursula Giebel, Dipl.-Ing. Smail Boukercha und M. Sc. Kateryna Loza für die Anfertigungen der zahlreichen REM-Aufnahmen.

Dipl.-Ing. Jürgen Gündel-Graber für die Anfertigung der Röntgenpulverdiffraktogramme, sowie die einfach unentbehrliche lustige Art und den morgendlichen frisch gebrühten Kaffee.

allen Mitarbeitern des Arbeitskreises für das freundliche Arbeitsklima und die Unterstützung bei Problemen.

Sabine Bollmann für die stete Bereitschaft zur Unterstützung bei der Fernleihe.

Sabine Kiefer für die Hilfe bei allen verwaltungstechnischen Problemen.

Frau Carola Fischer für jegliche Unterstützungen in allen möglichen Bereichen und zu jeder erdenkbaren Uhrzeit.

9 Danksagung

B. Sc. Tatjana Ruks für ihre tolle Arbeit als studentische Hilfskraft und ihrem Eifer bei der Untersuchung der Spirituosen.

B. Sc. Sven Fabig für seine tolle Arbeit als studentische Hilfskraft und seine Geduld bei der Herstellung der Latex-Werkstücke.

M. Sc. Gregor Dördelmann, Dr. Sven Backhaus, M. Sc. Diana Kozlova und B. A. Thorsten Schelske für das kritische Durchlesen dieser Arbeit.

Dr. Sven Range für die Kaffeepausen und das Verständnis „anders“ zu sein.

M. Sc. Gregor Dördelmann für die gemeinsame Zeit im Labor, für den Spaß, die Zerstreuung, die zahlreichen Gespräche, die Normalität und die stete Hilfe bei allen anfallenden Fragestellungen.

meiner ganzen „neuen“ Familie, die ich in den letzten Jahren ins Herz geschlossen habe und nicht mehr missen möchte.

meiner ganzen „alten“ Familie, die ich allesamt über alles liebe und schätze.

meiner Mutter für die bedingungslose Unterstützung, die Liebe, die Freundschaft und das unerschütterliche Vertrauen in meine Fähigkeiten.

Thorsten Schelske für die bisher erlebten wunderschönen Jahre und die Unterstützung in allen Lebensbereichen. Unsere gemeinsamen Träume waren meine größte Motivation.